



**Universidad Pablo de Olavide-CABD**

**Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular**

**Área de Biología Celular.**

**Regulación Post-transcripcional de la biosíntesis de**

**CoQ<sub>10</sub>.**

**Implicación de las proteínas de unión a ARNm sobre la  
expresión de *COQ7*.**

Memoria de tesis presentada por **M<sup>a</sup> Victoria Cascajo Almenara**, Licenciada en Biología para optar al grado de **DOCTORA**.

Los Directores

**Emilio Siendones Castillo**

Profesor Titular Biología Celular

**Myriam Gorospe Sararúa**

Ph.D., Senior Investigator, NIA, NIH



## CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

**D. EMILIO SIENDONES CASTILLO**, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DE BIOLOGÍA CELULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE.

### INFORMA

Que Dña. M<sup>a</sup> Victoria Cascajo Almenara, Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Regulación Post-transcripcional de la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>. Implicación de las proteínas de unión a ARNm sobre la expresión de COQ7”**, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a 25 de febrero de dos mil trece



## CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

**DÑA. MYRIAM GOROSPE SARASÚA**, PHD. DEGREE IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, STATE UNIVERSITY OF NEW YORK IN ALBANY (NY, USA) AND SCIENTIFIC ADVISOR TO THE NIA SCIENTIFIC DIRECTOR, NATIONAL INSTITUTE ON AGING (NIA), NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH).

### INFORMA

Que Dña. M<sup>a</sup> Victoria Cascajo Almenara, Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Regulación Post-transcripcional de la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>. Implicación de las proteínas de unión a ARNm sobre la expresión de COQ7”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a 25 de febrero de dos mil trece.

## Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
Estructura y funciones.....	8
Déficit de Coenzima Q <sub>10</sub> en humanos .....	10
Biosíntesis de Coenzima Q .....	13
Complejo multienzimático de biosíntesis de coenzima Q.....	15
Gen <i>clk-1/COQ7</i> .....	16
Localización y distribución del coenzima Q .....	17
Regulación de la biosíntesis de CoQ .....	18
Papel del receptor PPAR $\alpha$ .....	20
Proteínas implicadas en la regulación de los niveles de CoQ <sub>10</sub> .....	21
Regulación del gen <i>COQ7</i> .....	22
Mecanismos de regulación post-transcripcional .....	23
HuR/Elavl1 .....	25
AUF1 .....	26
hnRNP C1/C2 .....	27
<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>30</b>
La región 3'UTR del ARNm de <i>COQ7</i> presenta características de AREs y está implicada en la eficiencia de su traducción.....	30
El 3'UTR de <i>COQ7</i> es diana de varias proteínas de unión a ARNm. ....	31
HuR y hnRNP C1/C2 interaccionan con el ARNm de <i>COQ7</i> .....	33
HuR se une a una región proximal del 3'UTR del ARNm de <i>COQ7</i> .....	35
hnRNP C1/C2 es otra RBP capaz de interaccionar con el ARNm de <i>COQ7</i> . ....	36
HuR está implicado en la regulación de la expresión de <i>COQ7</i> ... ..	36
HuR estabiliza el ARNm de <i>COQ7</i> .....	38
El descenso de la expresión de HuR y hnRNP C1/C2 en ausencia de suero correlaciona con una disminución de los niveles de <i>COQ7</i> y de la tasa de biosíntesis de CoQ <sub>10</sub> .....	39
La eliminación del suero causa una disminución del ARNm de <i>COQ7</i> unido a HuR. ....	41
La estabilidad del ARNm de <i>COQ7</i> es menor en ausencia de suero. ....	42

## Índice

El nivel de expresión de la proteína COQ7 de ratón correlaciona con los niveles de HuR y hnRNP C1/C2 en diferentes etapas de desarrollo y tejidos...	43
Etapa embrionaria.....	44
Etapa post-embrionaria (hígado, corazón).....	44
<b>Discusión .....</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>57</b>
Estirpes de bacterias y transformación con ADN plasmídico.....	57
Muestras biológicas.....	57
Líneas celulares. ....	57
Muestras de ratón.....	58
Inmunoprecipitación de complejos RNP.....	58
Extracción de ARN y síntesis de cDNA.....	59
PCR en tiempo real.....	59
Amplificación de <i>hCOQ7</i> por PCR recombinante... ..	60
Transcripción <i>in vitro</i> .....	62
Ensayo de unión ARNm-proteínas celulares... ..	62
Síntesis in vitro de transcritos marcados con biotina y análisis de RBP unidas a ARN... ..	64
Análisis de la estabilidad del ARNm... ..	65
Extracción de proteínas celulares... ..	65
Extracción total.....	65
Extracción citoplásmica y nuclear. ....	65
Homogenado de muestras de ratón. ....	66
Cuantificación de proteínas por el método Bradford... ..	66
Análisis y detección de proteínas por Western Blotting... ..	66
Silenciamiento génico mediante transformación de oligos siRNA... ..	67
Transfección de líneas celulares con ADN plasmídico... ..	68
Extracción de lípidos y medida de los niveles de CoQ <sub>10</sub> .....	68
Cuantificación de las muestras de CoQ.....	68
Determinación de la tasa de síntesis de CoQ <sub>10</sub> ... ..	69
<b>Bibliografía.....</b>	<b>70</b>



## Abreviaturas

**AREs**\_Elementos ricos en A+U, del inglés *A + U-rich elements*

**ATP**\_Adenosín trifosfato

**ARNm**\_ARN mensajero

**AUF1/hnRNP-D**\_Ribonucleoproteína heterogénea nuclear D, del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D*

**(<sup>14</sup>C)-pHB**\_Para-hidroxibenzoato <sup>14</sup>C-radiomarcado

**cDNA**\_ADN complementario, del inglés *complementary DNA*

**Clk-1**\_ Clock abnormal protein 1

**CPT**\_Camptotecina

**CoQ**\_Coenzima Q o ubiquinona

**CoQ<sup>-</sup>**\_Semiquinona

**CoQH<sub>2</sub>**\_Coenzima Q reducido

**DHEA**\_Dehidroepiandrosterona

**DMQ**\_Demetoxi CoQ, demetoxiubiquinona

**ETFDH**\_Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase

**FBS**\_Suero fetal bovino del inglés *fetal bovine serum*

**FPP**\_Farnesil pirofosfato

**HMG-CoA**\_Hidroxi-metil-glutaril CoA-reductasa

**HNS**\_Secuencia de intercambio nucleo-citoplasma del inglés *nucleo cytoplasmic shuttling sequence*

**hnRNP**\_Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

**HPLC**\_Cromatografía líquida de alta resolución del inglés *high-performance liquid chromatography*

**HuR/Elavl1**\_Antígeno R humano, del inglés *human antigen R/embryonic lethal abnormal visión*

## Abreviaturas

**NES\_**Señal de exportación nuclear, del inglés *nuclear export nuclear*

**NRS\_**Secuencia de retención nuclear, del inglés *nuclear retention sequence*

**n-SMasa\_** Esfingomielinasa neutra dependiente de  $Mg^{2+}$ , del inglés *Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase*

**PCR\_**Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

**PPAR\_**Receptores activados por proliferadores de peroxisoma, de inglés *peroxisome proliferator-activated receptors*

**PTP\_**Poros de transición de permeabilidad mitocondrial, del inglés *mitochondrial permeability transition pore*

**RBP\_**Proteína de unión a ARN, del inglés *RNA-binding protein*

**RC\_**Región codificante

**CR\_**Restricción calórica, del inglés *calorie restriction*

**RNPs\_**Complejos ribonucleoproteicos, del inglés *ribonucleoprotein complex*

**ROS\_**Especies reactivas de oxígeno del inglés *reactive oxygen species*

**RRM\_**Motivo de reconocimiento a ARN, del inglés *RNA recognition motif*

**RXR\_**Receptor X retinoide

**siRNA\_**Pequeño ARN de interferencia, del inglés *small interfering RNA*

**UCPs\_**Proteínas desacoplantes, del inglés *uncoupling proteins*

**UTR\_**Región no traducida, del inglés *untranslate región*



## Resumen

El síndrome de deficiencia de Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) o ubiquinona es una enfermedad rara con un fenotipo muy variable que incluye encefalomiopatía, enfermedad multisistémica infantil severa, nefropatía, ataxia cerebelosa infantil y miopatía. Las causas genéticas son variables y a veces incluso desconocidas. Una deficiencia primaria se origina por mutaciones en genes implicados en la biosíntesis de este lípido, mientras que mutaciones en genes que no participan en la ruta de síntesis del CoQ<sub>10</sub> generan deficiencias secundarias. En muchos de los pacientes descritos no se ha identificado el sitio y la naturaleza exacta de las alteraciones que causan el déficit de ubiquinona.

La ruta de síntesis de esta molécula es bastante compleja y no ha sido completamente definida. Actualmente se han descrito diez genes que son requeridos para la síntesis de este lípido (COQ1-COQ10), de los cuales algunos no se conoce su función. Los datos disponibles acerca de la regulación de los genes COQs son escasos, sin embargo existen evidencias que indican que están sometidos a un control muy preciso, el cual debe englobar varios niveles de regulación.

El gen *COQ7* es un elemento regulador central en la biosíntesis de CoQ. Previamente en nuestro laboratorio se demostró que *COQ7* está regulado transcripcionalmente por el factor de transcripción NF-κB en condiciones de estrés y post-transcripcionalmente por ciclos de fosforilación-defosforilación en función de cambios nutricionales.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la idea de que la biosíntesis de CoQ está controlada a través de diferentes niveles de regulación. Por primera vez se demuestra que la expresión de uno de los genes COQ, concretamente *COQ7*, se modula por proteínas de unión a ARNm (RBPs) a través de su asociación a la 3'UTR del ARNm de *COQ7*. En este trabajo se han identificado a HuR y hnRNP C1/C2 como dos RBPs con capacidad de unión al 3'UTR de *COQ7* y se ha observado que HuR regula la expresión de *COQ7* estabilizando su ARNm. Nuestros datos demuestran que la expresión de *COQ7* y la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> disminuyen en condiciones limitantes de suero, y que este descenso es causado por una bajada de la estabilidad del ARNm de *COQ7* mediado por HuR.

Como se comentó anteriormente, numerosos pacientes con deficiencias en los niveles de CoQ<sub>10</sub> no presentan mutaciones en genes COQs. A partir de esta tesis surge la idea de que estos casos alberguen alteraciones en determinados mecanismos de regulación post-transcripcional, en concreto mutaciones en RBPs o en secuencias localizadas en cis en alguno de los genes COQs. Nosotros proponemos la necesidad de profundizar en la investigación de la regulación post-transcripcional de los genes COQs y sobre todo en la identificación de RBPs

## Resumen

implicadas y de las asociaciones funcionales entre RBPs-ARNm de los genes *COQs*. Los estudios realizados en este sentido ayudarían al conocimiento de la enfermedad, aportando información necesaria para el diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de CoQ<sub>10</sub>.

Se ha propuesto que la proteína COQ7 ejerce alguna función relacionada con el desarrollo, además de su actividad como hidroxilasa en la ruta síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Este trabajo muestra que los niveles de las proteínas COQ7, HuR y hnRNP C1/C2 varían de una forma similar en diferentes etapas del desarrollo embrionario y post-embrionario de ratón. Los niveles de proteína COQ7 en hígado y corazón, así como de HuR y hnRNP C1/C2 descendían en la edad adulta con respecto a la etapa embrionaria. De la misma forma, existía una correlación entre las variaciones de expresión de COQ7, y ambas RBPs en diferentes etapas de desarrollo embrionario. Estos resultados apoyan la existencia de una asociación funcional entre el ARNm de *COQ7* y ambas RBPs durante el desarrollo.

### 1. Estructura y funciones

El Coenzima Q (CoQ) o ubiquinona es el único lípido antioxidante sintetizado endógenamente por todas las células de mamífero. Este compuesto fue aislado y caracterizado en los años 50, época en la que también se describió su implicación en la cadena respiratoria mitocondrial (Crane, F.L. et al., 1957; Festenstein, G. N. et al., 1955). Finalmente, Wolf y colaboradores determinaron su estructura en 1958 (Wolf, D.E. et al., 1958).

La molécula de CoQ consiste en un anillo benzoquinónico polar, responsable de su capacidad redox, unido a una cadena lateral apolar formada por varias subunidades de isopreno, a través de la cual se ancla a las distintas membranas donde está localizada (Plácido Navas, Villalba, & De Cabo, 2007; Mikael Turunen, Olsson, & Dallner, 2004)(Plácido Navas et al., 2007). La longitud de la cola isoprenoide es característica de cada especie. Así por ejemplo, *Sacharomyces cerevisiae* presenta 6 unidades (CoQ<sub>6</sub>), *Caenorhabditis elegans* contiene 9 isoprenos (CoQ<sub>9</sub>) y distintas especies de mamífero sintetizan diferentes proporciones de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub>, siendo este último la principal forma sintetizada en humanos. La actividad redox de esta molécula se debe a su capacidad de intercambiar dos electrones en un ciclo redox entre la forma oxidada (ubiquinona, CoQ) y la forma reducida (ubiquinol, CoQH<sub>2</sub>) (Nakamura, T. and Hayashi, M., 1994; Navas, P. et al., 2007). Esta reacción puede llevarse a cabo por la transferencia simultánea de dos electrones en un único paso, o por la cesión de un solo electrón en dos pasos secuenciales con la consiguiente formación del intermediario parcialmente oxidado, semiquinona (CoQ<sup>•</sup>).

La ubiquinona se encuentra fundamentalmente en la membrana interna de la mitocondria, donde ejerce su principal función como transportador de electrones desde el Complejo I y el Complejo II al Complejo III de la cadena respiratoria (Kröger, A. and Klingenberg, M. 1973; Santos-Ocaña, C. et al., 2002; Lenaz, G., et al., 2007; Genova & Lenaz, 2011). Sin embargo, el CoQ está presente prácticamente en todas las membranas celulares, lo que sugiere la existencia de un sistema de transporte desde la mitocondria a otros compartimentos de la célula. Recientemente se ha descrito una

## Introducción

localización extramitocondrial, concretamente en el aparato de Golgi, para la biosíntesis de este lípido (Mugoni, V., et al., 2013).

El CoQ ejerce otras funciones de gran importancia para el metabolismo celular, actuando en la membrana plasmática como estabilizador del sistema antioxidante encargado de proteger a las células de agresiones externas (Navarro et al., 1995; Gómez-Díaz et al., 1997; Navas et al., 2007), ejerciendo como un potente antioxidante, al prevenir la peroxidación lipídica en la mayoría de las membranas celulares (Mellors, A. and Tappel, A.L., 1966). Junto a su actividad como antioxidante directo, el CoQ actúa como antioxidante indirectamente regenerando otras moléculas con esta actividad, como el  $\alpha$ -ascorbato o el tocoferol (Ernster and Forsmark-Andrée, 1993; Navas et al., 2007; Morré and Morré, 2011). La ubiquinona también ejerce una participa en el de apoptosis inducido por privación de suero, inhibiendo a la enzima n-SMasa. Esta proteína de la membrana plasmática hidrozila la esfingomielina a fosfocolina y ceramida, mensajero intracelular que activa la caspasa-3 (Okazaki et al., 1989; Villalba and Navas, 2000 ; Navas et al., 2002; Martín et al., 2003).

Echtay y colaboradores (Echtay et al., 2000; Klingenberg et al., 2001) demostraron que el CoQ era necesario para la función de algunas de las proteínas desacoplantes (UCPs). Estos estudios proponen que el CoQ interacciona con las UCP en la bicapa hidrofóbica, siendo capaz de sustraer  $H^+$  desde los ácidos grasos y desplazarlos hasta el grupo aceptor de  $H^+$  de las UCP, encargadas de dirigirlos hacia la matriz mitocondrial. Según Jarmuszkiewicz y colaboradores la acción de  $CoQH_2$  permitiría una completa o una mayor activación de las UCPs (Jarmuszkiewicz et al., 2009).

El CoQ inhibe la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) (Papucci et al., 2003). Se ha observado que el PTP presenta un sitio de unión a ubiquinona y es regulado por el complejo I de la cadena respiratoria (Devun et al., 2010; Fontaine and Bernardi, 1999; Walter, et al., 2002). El PTP es un complejo de proteínas situado en la membrana interna de la mitocondria y su composición exacta se desconoce. Actualmente se propone que está implicado en procesos de muerte celular o apoptosis, ya que una apertura prolongada resulta en una drástica inhibición de la síntesis de ATP, un dramático aumento de la producción de ROS y la liberación de

## Introducción

proteínas pro-apoptóticas mitocondriales y citocromo c (Halestrap, 2009; Rasola and Bernardi, 2007).

El hecho de que el CoQ esté presente en la mayoría de las membranas celulares de los organismos estudiados y desempeñe numerosas funciones celulares de gran importancia, parece ser la causa de la enorme complejidad observada en la patogénesis del déficit de CoQ<sub>10</sub> en humanos (Bentinger, Tekle and Dallner, 2010a).

## 2. Déficit de coenzima Q<sub>10</sub> en humanos

La deficiencia en los niveles de ubiquinona en humanos causa un conjunto de síntomas clínica y genéticamente muy heterogéneos, entre los que se encuentran: encefalomiopatía, enfermedad multisistémica infantil severa, nefropatía, ataxia cerebelosa infantil y miopatía. Actualmente se define como un síndrome autosómico recesivo, y su origen es bastante complejo (Quinzii, DiMauro and Hirano, 2007; Quinzii and Hirano, 2010).

La síntesis de CoQ<sub>10</sub> es bastante compleja y comprende múltiples reacciones. El estudio y la identificación de mutaciones que originan un déficit en los niveles de CoQ<sub>10</sub> ha permitido diferenciar entre deficiencias primarias y secundarias. Cualquier defecto en genes implicados directamente en la síntesis de este lípido (genes *COQs*), de los cuales se han identificado al menos diez (*COQ1* hasta *COQ10*), causa una deficiencia primaria de CoQ<sub>10</sub>. Mientras que las deficiencias secundarias están originadas por mutaciones en genes no relacionados con la ruta de biosíntesis. Sin embargo, numerosos pacientes con un déficit en el contenido de ubiquinona carecen de un diagnóstico genético claro (Artuch et al., 2009; Trevisson et al., 2011).

En 2006 se identificó la primera mutación asociada a un déficit en los niveles de CoQ<sub>10</sub>, una mutación en homocigosis en el gen *COQ2* en dos hermanos que presentaban enfermedad multisistémica infantil (Quinzii et al., 2006). Desde entonces se han identificado otras mutaciones patológicas en genes *COQs*, entre las que se encuentran mutaciones en *PDSS1* (Mollet et al., 2007) y *PDSS2*, que codifican para dos subunidades del heterotetámero que forman la proteína COQ1 (López et al., 2006). Adicionalmente se han descrito alteraciones en *COQ4* (Salviati et al., 2011), *COQ6*

## Introducción

(Heeringa et al., 2011), *COQ8-ADCK3* (Lagier-Tourenne et al., 2008; Xie et al., 2011) y *COQ9* (Duncan et al., 2009).

Como ya se ha comentado la patología de la deficiencia de CoQ<sub>10</sub> es compleja y variada (Emmanuele V et al. 2012). Se ha establecido que entre los fenotipos asociados a las deficiencias primarias demostradas genéticamente se encuentran el desorden multisistémico con deficiencia renal resistente a esteroides, observado en pacientes con mutaciones en *COQ1-PDSS1*, *COQ2* y *COQ6* y el desorden multisistémico sin deficiencia renal en pacientes con alteraciones en *COQ1-PDSS1* y *COQ9* y ataxia cerebelosa en pacientes con *COQ8-ADCK3* mutado (Trevisson et al. 2011; Jakobs et al. 2013).

Entre las deficiencias secundarias, se ha descrito una mutación en el gen de la aprataxina (proteína implicada en la reparación del ADN) (Le Ber et al., 2007), en el gen ETFDH, que codifica para la dehidrogenasa implicada en la transferencia de electrones (Gempel et al., 2007), y determinadas alteraciones mitocondriales (Montero et al., 2005; Sacconi et al., 2010). Hasta el momento se desconocen las causas de este tipo de deficiencia, aunque se proponen varias hipótesis. Así, se ha sugerido que estas mutaciones pueden interferir en la formación de un complejo formado por los productos de los genes *COQs*, necesario para la biosíntesis de ubiquinona, alterar la composición de la membrana interna de la mitocondria o provocar una mayor degradación de este lípido (Sacconi et al., 2010). Los niveles de ubiquinona también aparecen disminuidos en enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson (Shults et al., 1997).

Como ya se ha comentado el CoQ<sub>10</sub> es sintetizado en todas las células, aunque una pequeña proporción es incorporada a través de la dieta. De esta forma, el único tratamiento establecido en pacientes con déficit de CoQ<sub>10</sub> es su administración oral. En los casos de deficiencias secundarias la reducción en los niveles de esta molécula no es el origen central de su patología, pero se ha comprobado que el tratamiento ayuda a mejorar los síntomas en algunos de esos pacientes, mejoría que también se ha descrito en el caso de enfermedades neurodegenerativas (Galpern and Cudkowicz, 2007; Mancuso et al., 2010; Mancuso et al., 2009). La respuesta a la suplementación de CoQ<sub>10</sub> en casos de déficit primario es variable, de hecho en determinados pacientes la

## Introducción

recuperación es casi total, mientras que en otros la mejoría es leve y subjetiva, en cambio hay pacientes para los que el tratamiento no supone un beneficio evidente (Bhagavan & Chopra, 2006; Miles, 2007). Esta variabilidad en la respuesta sugiere la existencia de diversos mecanismos patofisiológicos de la deficiencia de ubiquinona, que junto con la farmacocinética de esta molécula, pueden influir en la efectividad del tratamiento. Los efectos beneficiosos implican un tratamiento temprano y el uso de dosis elevadas y prolongadas en el tiempo, ya que su biodisponibilidad es baja debido principalmente a su carácter hidrofóbico (Montini et al., 2008; Quinzii et al., 2007). Tradicionalmente, la biodisponibilidad de la ubiquinona se ha tenido en cuenta en relación a sus funciones más conocidas, como transportador de electrones o como antioxidante. Sin embargo, el CoQ<sub>10</sub> está implicado en otros procesos, los cuales para ser modificados quizás necesiten unos cambios más elevados de sus niveles intracelulares y/o extracelulares (Dallner and Sindelar, 2000).

El CoQ<sub>10</sub> también es administrado para tratar enfermedades cardiovasculares, y se ha descrito que el beneficio observado no correlaciona con la escasa cantidad de CoQ<sub>10</sub> que llega al corazón a través de la sangre, lo cual sugiere que la ubiquinona podría tener una acción antioxidante extracelular (Pepe et al., 2007).

Habría que destacar, en general, que en aquellos casos de déficit primario, el beneficio sobre los daños musculares es bastante evidente. Sin embargo, algunos síntomas neurológicos no mejoran con la administración de determinadas dosis de CoQ<sub>10</sub> (Quinzii, DiMauro and Hirano 2007; Quinzii and Hirano 2010; Trevisson, DiMauro, et al. 2011). Se postula que la aparición de daños cerebrales irreversibles, previos al tratamiento, y/o una escasa o nula eficacia del CoQ<sub>10</sub> para atravesar la barrera hematoencefálica, podrían explicar esta falta de mejoría sobre las funciones neurológicas (James et al. 2005). En este sentido, algunos estudios proponen la necesidad de administrar dosis adecuadas de CoQ<sub>10</sub>, en etapas iniciales de la deficiencia (Montini et al., 2008).

El limitado conocimiento actual acerca de la farmacocinética del tratamiento con CoQ<sub>10</sub>, así como la variabilidad observada en sus efectos sobre determinados pacientes, ponen de manifiesto la necesidad de intervenciones que permitan una efectiva estimulación o recuperación endógena de la síntesis de ubiquinona, y evite los

## Introducción

nulos o indeseados efectos de la administración de CoQ<sub>10</sub> (Gomez F et al., 2012). Para alcanzar este objetivo se requiere un mayor esfuerzo en el estudio de la función y la regulación de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de ubiquinona. Estos conocimientos, junto con las técnicas de secuenciación de nueva generación nos permitirá avanzar en el conocimiento de la enfermedad, nos ayudará a establecer nuevos fármacos y tratamientos y aportará información sobre la posible estimulación de la síntesis endógena de CoQ<sub>10</sub>, hecho que ya se ha investigado en *C.elegans*.

### 3. Biosíntesis de coenzima Q

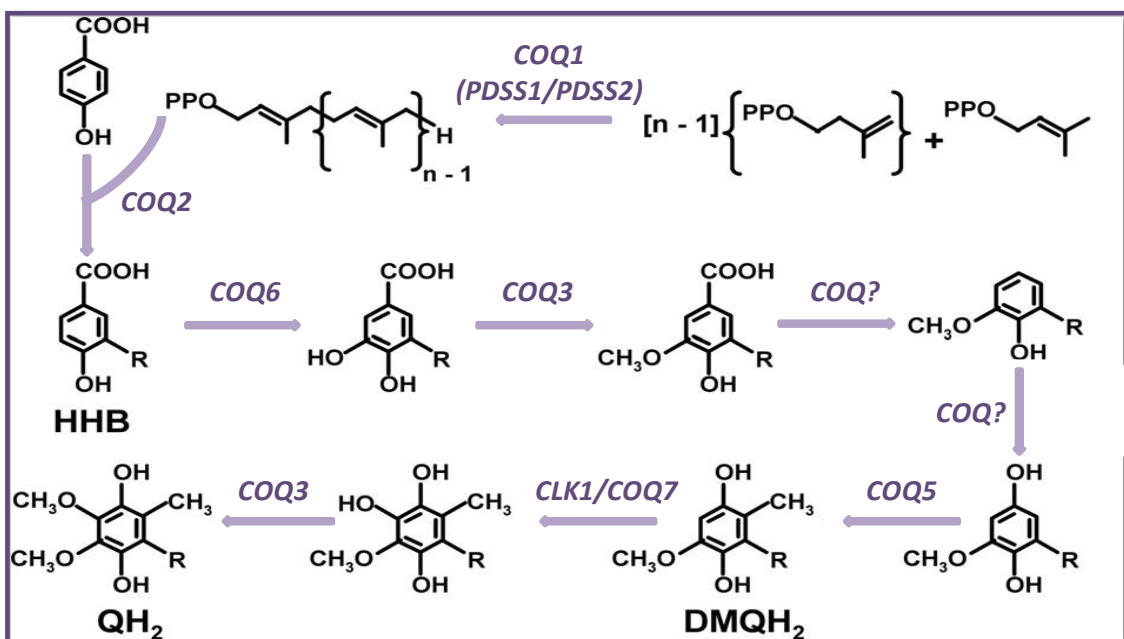
La ruta de biosíntesis del CoQ está bastante conservada entre los organismos estudiados. Así los genes de mamíferos han sido caracterizados por estudios de homología de secuencia y por complementación funcional de sus correspondientes mutantes nulos en levaduras (Tzagoloff and Dieckmann 1990; Barros et al. 2005; Johnson et al. 2005). Se ha establecido que la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> comprende múltiples etapas, comenzando con la formación del precursor aromático del anillo, el ácido 4-hidroxibenzoico ó 4-(HB), derivado de la tirosina, aminoácido esencial por lo que puede llegar a ser un factor limitante in vivo (Olson and Rudney 1983; Pennock 1983; Meganathan 2001). La cadena poli-isoprenoide se sintetiza a través de la ruta del mevalonato (Grunler 2004; Tran and Clarke 2007), a través de la cual el acetil-CoA es convertido a farnesil-PP (FPP). Esta ruta es común a la síntesis de otros lípidos como colesterol, dolicol y proteínas isopreniladas, (Tectebrhan et al., 1993; Turunen et al., 2004). Al contrario de lo que cabría esperar, no existe una regulación común para los lípidos de la ruta del mevalonato, ya que se sintetizan a unas tasas y cantidades muy diferentes, lo cual sugiere la existencia de puntos de regulación que afectan específicamente a la síntesis de cada producto (Bentinger et al., 2010).

La parte final de la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria en células eucariotas y en membranas citosólicas en procariotas e implica una serie de modificaciones del anillo aromático que darán lugar a la molécula de hidroquinona (QH<sub>2</sub>). Estas reacciones han sido ampliamente estudiadas en bacterias y levaduras mediante la identificación de los intermediarios acumulados en cepas mutantes deficientes en CoQ<sub>6</sub>. Estos mutantes no son capaces de crecer a partir de una fuente de carbono no fermentable, sin embargo esta deficiencia respiratoria



## Introducción

puede ser restaurada mediante la adición de CoQ<sub>6</sub> ó CoQ<sub>2</sub> al medio de cultivo. En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito al menos diez genes (*COQ1-COQ10*), de los cuales sólo seis se conocen su función enzimática, por lo que la información disponible sobre los genes *COQs* y su regulación es bastante escasa, sobre todo en humanos (Tran and Clarke, 2007).



**Figura 1: Etapa final de la ruta de biosíntesis de CoQ propuesta para eucariotas.** Comienza con la condensación del anillo aromático (4HB, ácido 4-hidroxibenzoico) a la cola isoprenoide por la proteína COQ2. Posteriormente las enzimas indicadas llevan a cabo una serie de modificaciones del anillo que darán lugar a la molécula de CoQ reducida (QH<sub>2</sub>). HHB, ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoico; DMQH<sub>2</sub>, 5-demetoksiubiquinol.

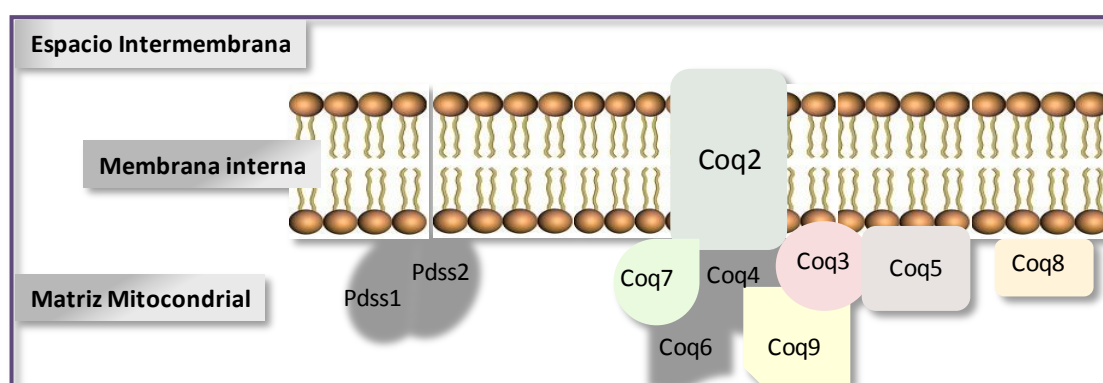
La primera enzima de la ruta llamada poliprenil difosfato sintasa (Coq1p) ensambla la cola poli-isoprenoide de la ubiquinona y determina su longitud en función del número de unidades de isoprenos (Bentinger et al., 2010). A continuación la enzima Coq2p cataliza la condensación de esta cadena y la molécula 4-HB (Ashby & Edwards, 1990). A continuación Coq6p lleva a cabo una reacción de hidroxilación. Recientemente se ha propuesto que esta proteína realiza la primera hidroxilación del anillo en el carbono C5 pero no la segunda (C1) (Ozeir et al., 2011). El siguiente paso de la ruta es catalizado por la enzima Coq3p, responsable de la primera y la última reacción de *O*-metilación (Hsu et al., 1996; Jonassen and Clarke, 2000). Aún no han sido determinadas las dos enzimas que realizan las dos reacciones siguientes. Coq5p cataliza la reacción de C-metilación que continúa con una hidroxilación ejercida por Coq7p (Barkovich et al., 1997; Marbois and Clarke, 1996; Vajo et al., 1999). La función

## Introducción

de Coq4p, Coq8p y Coq9p son desconocidas actualmente, aunque diversos trabajos muestran que poseen funciones reguladoras en la síntesis de CoQ (Casarin et al., 2008; Hsieh et al., 2007; Marbois et al., 2009; Xie et al., 2011). En 2005 Barros y colaboradores identificaron el mutante nulo *coq10* en *S. cerevisiae*. Esta cepa presenta deficiencias en las actividades NADH-citocromo c reductasa y succinato-citocromo c reductasa, pero a diferencia de los demás mutantes deficientes en CoQ<sub>6</sub>, los mutantes *coq10* poseen niveles de ubiquinona cercanos a la estirpe silvestre. En este trabajo se propone que Coq10p se une al CoQ<sub>6</sub> transportándolo a su localización adecuada (Barros et al., 2005).

### 3.1. Complejo multienzimático de biosíntesis de coenzima Q

Diversos estudios muestran la existencia de un complejo formado por las proteínas Coq en *S. cerevisiae*. Así, se ha observado que los mutantes nulos *coq3*, *coq4*, *coq5*, *coq6*, *coq7*, *coq8* y *coq9* acumulan el mismo intermediario temprano, el producto del gen Coq2 o HHB. Se ha descrito también que una delección en determinados genes *COQs* producen una acumulación simultánea de varias proteínas Coq y que existen interacciones físicas entre algunas de ellas (Gin and Clarke, 2005; Hsieh et al., 2007; Marbois et al., 2005, 2009). Además de ser consistentes con la hipótesis de que un complejo multienzimático, formado por las proteínas Coq, sea el responsable de la conversión del HHB a CoQ<sub>10</sub>, estas observaciones sugieren que la ruta de biosíntesis está fuertemente regulada.



**Figura 2: Modelo del complejo de síntesis de CoQ propuesto en levaduras.** El complejo se compondría de las proteínas indicadas asociadas a la membrana a través de Coq2, que posee un dominio transmembrana.

### 3.2. Gen *clk1/COQ7*

Este gen aislado y caracterizado en levadura, codifica para una proteína del mismo nombre que actúa como hidroxilasa del intermediario DMQ<sub>6</sub> en la penúltima reacción de la síntesis de CoQ<sub>6</sub> (Marbois and Clarke, 1996). Determinados mutantes puntuales del gen *COQ7*, en *S. cerevisiae*, acumulan DMQ<sub>6</sub> además del HHB detectado en el resto de mutantes nulos (Padilla et al., 2004; Tran et al., 2006). Este hecho indica que una mutación puntual en la proteína Coq7 podría dar lugar a un polipéptido con capacidad de formar parte del complejo de biosíntesis, modificándose así el HHB hasta DMQ<sub>6</sub>, sin embargo, esta proteína sería incapaz de hidroxilar a su intermediario, acumulándose en estos mutantes. Adicionalmente, se ha demostrado que estas mutaciones puntuales en Coq7p aumentan los niveles de las proteínas Coq3 y Coq4 con respecto a los mutantes *coq7* nulos ( Padilla et al. 2004; Gin and Clarke 2005) y existen evidencias de la interacción entre estas tres proteínas (Tran et al., 2006). A raíz de estos resultados se plantea un posible papel regulador de la proteína Coq7, concretamente en la organización del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ.

El gen *clk-1* de *Caenorabditis elegans* es homólogo al gen *COQ7* de *S. cerevisiae* y está conservado funcional y estructuralmente en eucariotas, incluyendo ratones y humanos (Ewbank et al., 1997; Vajo et al., 1999). La mutación de *clk-1* en nematodos alimentados con una dieta estándar de *E. coli*, productora de CoQ<sub>8</sub>, provoca un aumento de la esperanza de vida de estos organismos. El efecto pleiotrópico de esta mutación incluye un retraso en el desarrollo embrionario y post-embrionario. Sin embargo, cuando el CoQ<sub>8</sub> es eliminado de la dieta, los mutantes permanecen detenidos en el desarrollo. La mutación *clk-1* provoca un déficit en los niveles de CoQ<sub>9</sub> y una acumulación del intermediario DMQ<sub>9</sub> (Asencio et al., 2009; Jonassen, Larsen and Clarke, 2001; Wong, Boutis and Hekimi, 1995).

En ratones la mutación en homocigosis del gen *mclk-1* es letal y los embriones no superan su desarrollo por encima del estadio E10.5. Por el contrario, en heterocigosis la mutación es viable. De hecho los ratones son fértiles y no muestran anomalías destacada, mostrando además niveles normales de CoQ (Nakai et al., 2001; Stepanyan et al., 2006). Sin embargo se detectó que su distribución submitocondrial está modificada en estos ratones (Lapointe et al. 2012), efecto que no se observó en

## Introducción

ratones mutantes en otros genes *COQs*. Estos estudios además de corroborar que este gen es esencial para la síntesis de ubiquinona, muestran que es requerido para el correcto funcionamiento de la mitocondria y el desarrollo neurológico.

Por lo tanto, la proteína Coq7 aparte de su función enzimática como hidroxilasa del DMQ podría estar también implicada en procesos de desarrollo (Asencio et al., 2009; Branicky, Bénard and Hekimi, 2000; Felkai et al., 1999; Lapointe and Hekimi, 2008; López-Lluch et al., 2010). Así, además de la necesidad de profundizar en el estudio de las funciones de la proteína Coq7 en distintos organismos, y de la implicación del CoQ<sub>10</sub> en procesos de envejecimiento y el desarrollo, nosotros proponemos un análisis detallado de la regulación del gen *COQ7*.

### 4. Localización y distribución del coenzima Q

Dada la enorme hidrofobicidad de la molécula de ubiquinona, se postula que en la naturaleza sólo puede presentarse formando micelas, disueltos en bicapas lipídicas y/o unido a proteínas (Lenaz et al., 2007), aunque en células sólo esté presente en las dos últimas formas.

Intracelularmente, la ubiquinona se encuentra fundamentalmente en la membrana interna de la mitocondria (Turunen et al., 2004). Todos los genes aislados en levadura codifican para proteínas con una señal de transporte a la mitocondria (Santos-Ocaña et al., 2002). Sin embargo, como ya se ha citado, el CoQ está presente prácticamente en todas las membranas celulares (Morré and Morré, 2011).

Extracelularmente, el CoQ se localiza en todos los órganos y tejidos, encontrándose también asociado a lipoproteínas de la sangre. Este lípido no es distribuido a los órganos a través de la circulación, lo que indica que debe ser sintetizado en todos los tejidos. Su concentración tisular depende de la síntesis *de novo*, mientras que los niveles en plasma están influidos por la dieta (Navas et al., 2007; Turunen et al., 2004). Los niveles de CoQ varían entre distintos tejidos y membranas según las necesidades funcionales, de hecho su concentración es diferente incluso en diferentes regiones de un mismo órgano (Turunen et al., 2002).

La vida media del CoQ es relativamente corta, oscilando entre 50 y 125 h, en función del tejido, lo que sugiere que su tasa de renovación debe ser elevada. Los

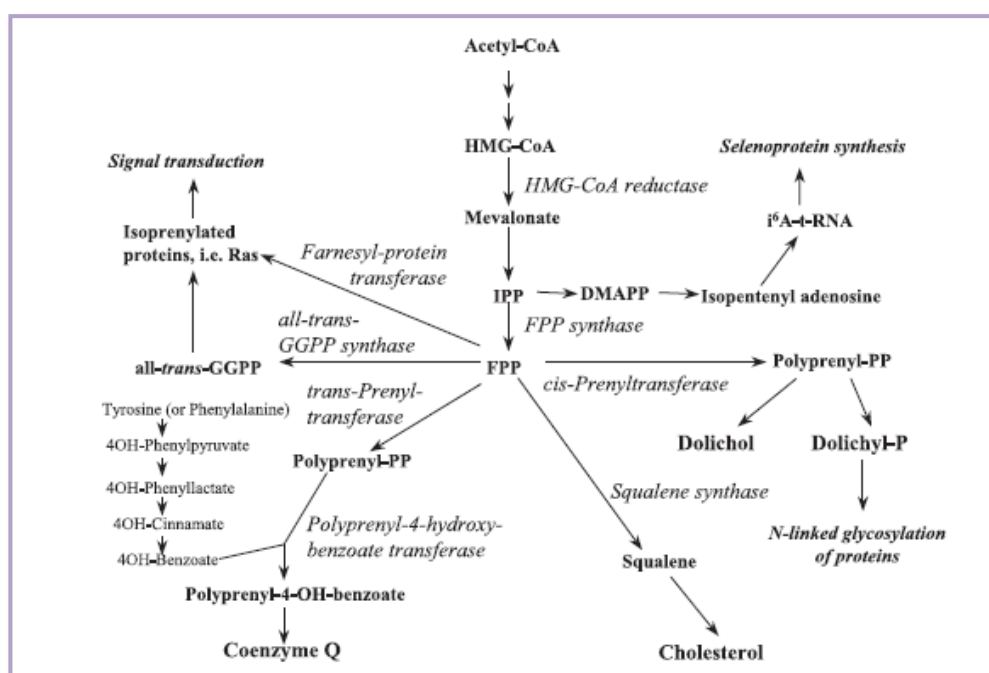
## Introducción

lípidos de la ruta del mevalonato muestran una vida media similar en la mayoría de los tejidos, excepto en el cerebro, órgano en el que el colesterol y el dolicol presentan una vida media por encima de las 1.000h, mientras que la del CoQ es de 90 h. Esto nos indica la importancia de la ubiquinona en el cerebro y apoya la idea de la regulación de la parte final de la síntesis de los lípidos derivados de la ruta del mevalonato (Turunen et al., 2002).

La variabilidad en la distribución tisular del CoQ junto con su relativamente corta vida media, además de indicar el complejo mecanismo que regula el contenido de este lípido, refleja que los niveles de ubiquinona responden a un equilibrio entre la tasa de síntesis y la tasa de degradación en tejido (Dallner and Sindelar, 2000; Gustav et al., 2003).

### 5. Regulación de la biosíntesis de CoQ

La información disponible acerca de la regulación de la síntesis de ubiquinona y de los mecanismos por el que los niveles de CoQ se modifican es bastante escasa. La enzima HMG-CoA reductasa es la principal enzima reguladora de la ruta del mevalonato y afecta principalmente a la síntesis del colesterol. Las estatinas, drogas que inhiben a la HMG-CoA reductasa afectan a la síntesis y la cantidad de todos los lípidos de esta ruta (Elmberger et al., 1991; Turunen et al., 2004; Willis et al., 1990).



## Introducción

**Figura 3: Ruta del mevalonato.** Se inicia con la conversión del acetil-CoA a farnesil-PP y la posterior síntesis de CoQ, colesterol y dolicol. Las enzimas implicadas se indican en cursiva.

Determinadas rutas metabólicas están reguladas por algunos metabolitos e intermediarios, así el farnesol y el ácido vanílico (anillo sustituido sin cadena lateral) se han propuesto como posibles moduladores de la síntesis de CoQ (Correll et al., 1994). Aunque hay pocos estudios disponibles, se ha descrito que determinadas hormonas, entre ellas la tiroxina, cortisona, adrenalina y la dehidroepiandrosterona (DHEA) aumentan los niveles de ubiquinona en hígado de rata (Turunen et al., 2002). Por otra parte, ratones expuestos a temperaturas frías (4°C) muestran un mayor contenido en CoQ en el hígado (Aithal and Joshi, 1968; Bentinger et al., 2008). Debido a que estas alteraciones afectan a numerosos procesos biosintéticos, es bastante difícil relacionarlos directamente con una modificación en los niveles de CoQ.

La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), el selenio y la vitamina A también están implicados en mecanismos que alteran los niveles de ubiquinona (Navarro et al., 1998). Una dieta rica en vitamina A disminuye el contenido de CoQ en el hígado mientras que su deficiencia induce un aumento de este lípido. Los niveles de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y CoQ también muestran cierta relación, así se ha descrito que la administración de vitamina E, además de aumentar sus propios niveles, induce un incremento de los niveles de CoQ, mientras que una baja cantidad de vitamina E en la dieta disminuye el contenido de ambos lípidos (Ibrahim et al., 2000). Este hecho refleja la dependencia biológica de ambos antioxidantes, de hecho se sabe que el CoQ regenera el  $\alpha$ -tocoferol protegiéndolo de su descomposición por otros radicales (Crane and Navas, 1997).

El ejercicio y la dieta también aparecen como moduladores de la cantidad de CoQ en el organismo (Quiles et al., 1994). Así, la restricción calórica (CR) o dieta baja en calorías alarga la vida y mejora la salud de muchos organismos modelo (Hursting et al., 2003). En algunos estudios realizados en rata, se ha demostrado que la RC altera la ratio  $Q_9/Q_{10}$  en función del tejido (Kamzalov and Sohal, 2004). Por otro lado, se ha observado que en RC la expresión del ARNm de los genes COQs sigue un patrón determinado, y que esta intervención regula su expresión de una forma específica de tejido (Parrado-Fernández et al., 2011), sin embargo no se conocen los mecanismos implicados durante esta intervención.

### 5.1. Papel del receptor PPAR $\alpha$

Los peroxisomas son orgánulos implicados en el metabolismo de los lípidos, participando por ejemplo en la oxidación de los ácidos grasos. En este orgánulo, precisamente, se localizan varias enzimas de la ruta del mevalonato. Un aumento en la cantidad de peroxisomas tiene gran importancia biológica. Los inductores de peroxisomas son sustancias naturales y sintéticas, muy diferentes estructuralmente. Entre ellos, los fibratos son los más usados en tratamientos de hiperlipidemia, ya que al inducir la biogénesis de los peroxisomas y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, se produce una disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma (Bentley et al., 1993; Reddy and Chu, 1996). Aunque no se han identificado componentes de la maquinaria de biosíntesis de CoQ en estos orgánulos, el tratamiento con inductores de peroxisoma en rata, provoca un incremento en la concentración de ubiquinona en varios tejidos, excepto en cerebro, como consecuencia de un aumento en la tasa de síntesis (Aberg et al., 1998). Tras el tratamiento en humanos, no se ha observado una inducción de peroxisomas pero sí de los niveles de enzimas peroxisomales (Bentley et al., 1993).

El proceso de inducción de peroxisomas está mediado por una familia de receptores esteroideos denominados receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (Issemann & Green, 1990). La unión de PPARs a sus ligandos, entre los que se encuentran los inductores de peroxisoma, induce su dimerización con otro receptor, el receptor X retinoide (RXR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La unión de este complejo a sus elementos de respuesta en los promotores de determinados genes activa o reprime específicamente su transcripción. De esta forma, PPAR $\alpha$  regula genes que codifican para apolipoproteínas, lipoproteína lipasa, proteínas transportadores de ácidos grasos, enzimas que metabolizan ácidos grasos mitocondriales y peroxisomales (Hunt et al., 2000).

Estudios realizados en ratones nulos en PPAR $\alpha$  (Turunen et al., 2000) y RXR (Bentinger et al., 2003) muestran como los mutantes en PPAR $\alpha$  presentan cantidades similares de CoQ, colesterol y dolicol, que los ratones silvestres, concluyendo que este receptor no está implicado en la regulación de los niveles constitutivos de las enzimas de la ruta del mevalonato. Sin embargo, el contenido de ubiquinona de los ratones

## Introducción

PPAR $\alpha$  nulos aumentaba tras la administración de inductores de peroxisoma. Los ratones deficientes en RXR $\alpha$ , además de la inducción del ARNm de varias apolipoproteínas, colesterol en suero y niveles de triglicéridos (situación no observada en ratones nulos en PPAR $\alpha$ ), presentaban una disminución en la concentración de CoQ en hígado, mientras que los niveles de colesterol y dolicol no varían. Estos resultados indican que aunque PPAR $\alpha$  no regula la transcripción constitutiva de los genes de biosíntesis de CoQ, si participa en el proceso de inducción por inductores de peroxisoma. En cambio RXR $\alpha$  está implicado en la transcripción constitutiva de genes específicos de la síntesis de CoQ. De hecho, un estudio de la secuencia promotora del gen COQ7 muestra que este gen presenta sitios de unión para RXR (Brea-Calvo et al., 2009).

### 5.2. Proteínas implicadas en la regulación de los niveles de CoQ<sub>10</sub>

La ruta de biosíntesis del CoQ<sub>10</sub> no está completamente caracterizada. Actualmente aún faltan por identificar algunas enzimas que actúan en determinados pasos de la modificación del anillo benzoquinónico (primera C-hidroxilación y decarboxilación). De la misma forma, se desconoce la función de algunas proteínas cuya alteración afecta los niveles de ubiquinona, como es el caso de la proteína COQ9 y COQ10. En este contexto, se han descrito proteínas con una posible función reguladora dentro de la ruta de síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Así, se ha propuesto que la proteína ADCK3 (COQ8) desempeña una actividad kinasa sobre otras proteínas COQs (COQp) (Xie et al., 2011) y que una mutación en el gen *ADCK3* causa una disminución en los niveles de CoQ<sub>10</sub> (Horvath et al., 2011; Mollet et al., 2008). Otra proteína con una posible función reguladora es COQ4, a la que se le asigna un papel estructural en la organización del complejo de síntesis en levadura y cuya alteración también origina un déficit de ubiquinona (Casarin et al., 2008; Marbois et al., 2009). En relación a la proteína COQ7, se postula que en *S. cerevisiae* realiza una función dual, actuando como hidroxilasa del intermediario DMQ<sub>6</sub> convirtiéndolo en CoQ<sub>6</sub> y una función reguladora en el ensamblaje del complejo multienzimático de biosíntesis de ubiquinona (Padilla et al. 2004; 2009). Desde que se identificó en 2006 la primera mutación causante de una disminución en los niveles de CoQ<sub>10</sub>, se han descrito múltiples pacientes con alteraciones en algunos de los genes *COQs* asociadas al



## Introducción

síndrome de deficiencia de este lípido. En contraste, existen casos de déficit que no muestran un diagnóstico genético claro y no presentan mutaciones en los genes *COQs*, lo cual sugiere la posibilidad de que alberguen alteraciones en proteínas implicadas en otros procesos de regulación de la síntesis de CoQ, cuya actividad exacta se desconoce en la actualidad, o en proteínas implicadas en otros procesos de regulación de la síntesis de ubiquinona. Todos estos datos reflejan la necesidad de profundizar en el conocimiento de la regulación de la síntesis CoQ<sub>10</sub>, con el objetivo de avanzar en el diagnóstico genético así como en el tratamiento de pacientes con síndrome de déficit de ubiquinona.

### 5.3. Regulación del gen *COQ7*

Apenas existen datos disponibles de la regulación a nivel transcripcional de los genes que sintetizan CoQ<sub>10</sub> a pesar de los esfuerzos y los estudios realizados, excepto el efecto de la RC en la expresión de los genes *COQs* y que *COQ7* es transcripcionalmente regulado por el factor de transcripción NF-κB. Así en respuesta a estrés inducido por el quimioterápico CPT (camptotecina) en células humanas, este factor de transcripción se une específicamente al promotor de *COQ7*, provocando un incremento en los niveles de esta proteína y el consiguiente aumento del contenido de CoQ<sub>10</sub>, que actúa como antioxidante (Brea-Calvo et al., 2009). Se ha descrito que la proteína Coq7 muestra también un nivel de regulación post-transcripcional. De hecho, se ha demostrado que en *S. cerevisiae* la actividad de la proteína está regulada por fosforilación, en respuesta a cambios nutricionales. Estos cambios en el estado de fosforilación implican variaciones en los niveles de CoQ<sub>6</sub>, de forma que en condiciones de bajo nivel de glucosa o fuentes de carbono fermentable, Coq7p se encuentra en estado fosforilado, correlacionando con una disminución en los niveles de CoQ<sub>6</sub>. Por el contrario, elevados niveles de glucosa, inducen la defosforilación de Coq7p, observándose un aumento de CoQ<sub>6</sub> (Martin-Montalvo et al., 2011).

El CoQ<sub>10</sub> es un lípido esencial y su déficit tiene unos efectos muy negativos para el organismo. La presencia de ubiquinona en prácticamente todas las células y membranas, las múltiples funciones en las que está implicado y las diferencias en los niveles de esta molécula entre distintos órganos, en función de las necesidades fisiológicas, sugieren el estricto mecanismo de control al que su síntesis debe estar

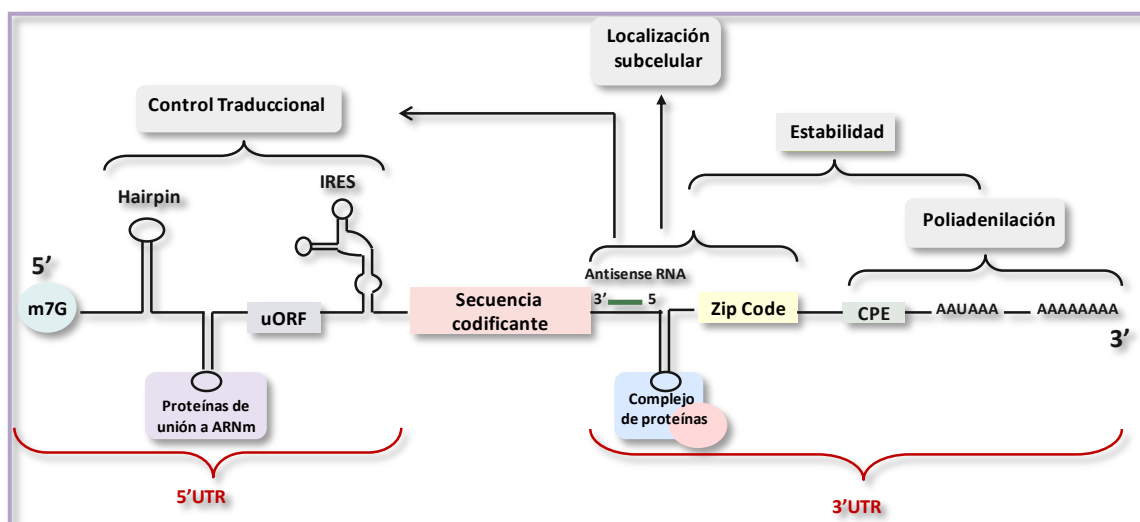
sometida. Nosotros proponemos que deben existir varios niveles de regulación de la síntesis de CoQ<sub>10</sub>, que incluirían una etapa de regulación transcripcional (síntesis del ARNm de los genes *COQs*), una fase de regulación post-transcripcional (metabolismo del ARNm y traducción de proteínas COQs) y una etapa final de control post-traducciona (modificación de proteínas COQs, regulación de su actividad y formación del complejo de biosíntesis).

### 6. Mecanismos de regulación post-transcripcional

La expresión génica es un proceso básico y fundamental para el correcto funcionamiento y desarrollo celular, por lo que todas las etapas implicadas deben estar estrictamente reguladas. Las células son capaces de integrar toda la información intra y extracelular para organizar de forma coordinada un mecanismo regulador múltiple que le permite desarrollar todas sus funciones biológicas. Tras la transcripción o síntesis del pre-ARNm, esta molécula sufre una serie de modificaciones que darán lugar a la molécula de ARNm madura, que será transportada y localizada en el citoplasma para su traducción y posterior degradación. Todos estos procesos están también perfectamente controlados y constituyen un nivel adicional de regulación de la expresión génica, conocido como regulación post-transcripcional. Durante los últimos años, se está avanzando enormemente en el conocimiento de la molécula de ARN y de los mecanismos implicados en la regulación de su metabolismo. Estas investigaciones nos está permitiendo profundizar en el conocimiento de la expresión génica, así como de numerosas enfermedades desconocidas hasta el momento y que están asociadas a alteraciones en algunos de estos mecanismos de regulación (Cazzola and Skoda, 2000; Mata, Marguerat and Bähler, 2005).

Entre las modificaciones que sufre el pre-ARNm se encuentran la eliminación de intrones, la incorporación de un nucleótido modificado ó caperuza (7-metilguanosina) en el extremo 5' y de la cadena de poliA (100-250 residuos de adenina) en 3', dando lugar así a la cadena de ARNm madura, que presenta una estructura en la que se distinguen tres regiones, la región 5'UTR (untranslate region), la región codificante compuesta por tripletes de nucleótidos que codifican un aminoácido y la región 3'UTR (Pesole et al. 2001; Mignone et al. 2002).

## Introducción



**Figura 4: Representación de la estructura del ARNm y de algunas regiones de regulación post-transcripcional.**

Desde el extremo 5' al 3': UTR, untranslation region; m7G: 7-metil-guanosina; hairping: estructura secundaria en forma de horquilla; uORF, pauta abierta de lectura río-arriba; IRES, sitio interno de entrada de ribosomas; ARES, elementos ricos en adenina y uracilo; CPE, elementos de poliadenilación citoplásmicos; AAUAAA, señal de poliadenilación.

Aparte de la región que codifica para una proteína, la molécula de ARNm contiene secuencias reguladoras que no se traducen, conocidas como 3' y 5'UTR (*untranslated region*). Estas zonas del ARNm juegan un papel esencial en los procesos de regulación post-transcripcional. Otras estructuras reguladoras del ARNm son los ARES (A + U-rich elements), zonas ricas en adenina y uracilo, localizadas preferentemente dentro de la 3'UTR. En la mayoría de los casos descritos ARES presenta motivos AUUUA/AUUUUA repetidos una o más veces. Estos elementos están implicados en la regulación de la estabilidad de los transcritos en los que se localiza, incrementando así su tasa de renovación (Chen and Shyu 1995; Brennan and Steitz 2000; Barreau, Paillard, and Osborne 2006). Además de ARES, dentro de las UTRs se localizan múltiples secuencias capaces de interactuar con proteínas de unión a ARNm (RBPs), con pequeños ARN interferentes y microARNs (Lu and Clark, 2012; Rogaev et al., 2008), y con otros factores que intervienen en la regulación de procesos como la traducción y la estabilidad de los ARNm a los que se asocian (Mignone et al., 2002). En la mayoría de los casos, estos elementos interactúan de manera combinatoria o competitiva a sus secuencias en los transcritos diana. Concretamente las RBPs pueden asociarse y unirse a un ARNm común, formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs), capaces de controlar cualquier aspecto relacionado con el metabolismo de los ARNm diana (Glisovic et al., 2008; Pullmann Jr. et al., 2007). De tal

## Introducción

forma que varias RBPs pueden competir por el mismo ARNm de una forma excluyente, por lo que la unión de una impide la asociación de otra RBP, o pueden interaccionar de una manera cooperativa, en cuyo caso la unión de una RBP favorecería la unión de otra proteína al mismo ARNm. En contraste, se han descrito casos en los que la interacción de varias RBPs, ya sea de forma conjunta o separada, no muestra un efecto aparente (Lal et al., 2006).

Las RBPs están implicadas en múltiples procesos celulares y muestran una enorme especificidad y variabilidad entre sus ARNs diana. Estas proteínas están construidas a partir de unos pocos módulos estructurales. Así se ha demostrado que a través de la organización y repetición de estos módulos, las RBPs alcanzan una gran especificidad y versatilidad en sus funciones y sustratos. La combinación de estas secuencias estructurales y los dominios enzimáticos definen y regulan la función de las RBPs (Lunde, Moore and Varani, 2007). Estas proteínas establecen un vínculo entre distintos procesos de regulación post-transcripcional, permitiendo el correcto funcionamiento y coordinación de esta compleja red de eventos, cuya alteración puede generar varias enfermedades (Cazzola and Skoda, 2000; Cooper, Wan and Dreyfuss, 2009; Srikantan and Gorospe, 2012).

### HuR/Elavl1 (human antigen R/ embryonic lethal abnormal vision)

HuR es una de las RBPs mejor caracterizadas y más estudiadas. Esta proteína pertenece a la familia Elav y fue identificada originalmente en *Drosophila melanogaster* como una proteína esencial para el desarrollo neuronal (Ma et al., 1996). Esta proteína tiene un tamaño de unos 34 kDa y se expresa de forma ubicua, mientras que otros miembros de esta familia (HuB, HuC o HuD) sólo se expresan en neurona. La interacción entre HuR a sus ARNm dianas tiene lugar a través de 3 dominios de unión a ARNm denominados RRM (Kim et al. 2011). La localización de HuR es predominantemente nuclear, aunque su transporte al citoplasma es fundamental para el desarrollo de sus funciones. La presencia del dominio HNS (HuR-nucleo cytoplasmic shuttling sequence) en la proteína permite su intercambio en ambos sentidos (Fan and Joan A Steitz 1998; Doller, Pfeilschifter and Eberhardt 2008).

La traducción está íntimamente acoplada a la renovación y la estabilidad de los ARNm. HuR participa en la regulación de la traducción y la estabilidad de múltiples y

## Introducción

muy diversas dianas, mediante la unión de sus dos primeros dominios RRM a regiones AREs situadas en el mensajero. Se ha sugerido que HuR estabiliza a los transcritos protegiéndolos de su degradación en el citoplasma, pero no existe una información detallada sobre el mecanismo por el que HuR influye exclusivamente en la traducción de algunos ARNs o en la estabilidad de otros o en ambos a la vez de una forma coordinada (Chang et al., 2010; Chen, Xu and Shyu, 2002; Galbán et al., 2008; Wang et al., 2000).

### AUF1/ hnRNP-D (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D)

Esta proteína también muestra afinidad por regiones ARES y al igual que la mayoría de las RBPs tiene múltiples funciones (Blaxall, Pende, Wu, & Port, 2002). Así, se ha descrito que AUF1 tiene capacidad de unión a ADN, además de regular la estabilidad, la traducción y renovación de los ARNm diana (Barker et al., 2012; Gratacós and Brewer, 2010), entre los que se encuentra la ciclina D1 (Al-Khalaf et al., 2011).

Varios estudios muestran la interacción entre estas HuR y AUF1 (Lal et al., 2004; Zou et al., 2010). En estos estudios se muestra como ambas proteínas pueden ejercer su función de forma cooperativa o competitiva según el ARNm diana, y que tanto HuR como AUF1, pueden ejercer su papel como estabilizadores o desestabilizadores de los transcritos a los que se une, en función del estímulo y de la naturaleza del mensajero diana (Barker et al., 2012). Un ejemplo es el ARNm de JunD, así se ha descrito que una disminución de poliaminas aumenta la unión de HuR y disminuye la interacción a AUF1, induciéndose la estabilización del transcrito de JunD. Las poliaminas, en este caso, actúan modificando la interacción competitiva de HuR y AUF1 a la región 3'UTR del transcrito de JunD regulando así la estabilidad del ARNm y por tanto los niveles de proteína (Zou et al., 2010).

### hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)

Esta familia de proteínas se identificó en células humanas y comprende un gran número de RBPs nombradas desde A1 hasta U (Dreyfuss et al., 1993; Piñol-Roma and Dreyfuss, 1993). hnRNPs son proteínas multifuncionales y están implicadas en numerosos aspectos relacionados con la biogénesis y el metabolismo de los ARNm,

## Introducción

teniendo la capacidad de formar complejos con la mayoría de los pre-ARNm nacientes e intervenir en su estabilización y procesamiento (Park et al., 2012). Entre las proteínas más abundantes de esta familia se encuentran hnRNP C1/C2, consideradas “hnRNP centrales” (“core hnRNP”) ya que ayudan al empaquetamiento del ARN nuclear (Huang et al., 1994; McAfee et al., 1996).

hnRNP C1/C2 se compone de dos isoformas originadas por splicing alternativo, C1 de 41 kDa y C2 de 43 kDa, ambas se unen cooperativamente formando un heterotetrámero C1<sub>(3)</sub>C2. Su estructura es modular y consiste en un único dominio RRM en su extremo N-terminal, una señal de exportación nuclear (NES) en el extremo C-terminal, donde además se localiza el dominio de oligomerización que controla la interacción C1-C1 y por último, en el centro de la proteína una secuencia de retención nuclear (NRS). El tetrámero C1/C2 es fundamentalmente nuclear, de hecho el dominio NRS predomina sobre el NES en la mayoría de las condiciones celulares pero en determinadas circunstancias esta proteína ejerce su función en el citoplasma (Nakielnny and Dreyfuss, 1996; Piñol-Roma, 1997).

Estas proteínas también poseen la capacidad de unión a ADN actuando como factores de transcripción propiamente dichos, de hecho se ha descrito su interacción a elementos de respuesta a hormonas presentes y su implicación en la regulación de genes de respuesta a hormonas (Chen, Hewison and Adams, 2006).

En esta tesis hemos abordado el análisis del control de la síntesis de CoQ<sub>10</sub> en células humanas, a través del estudio de la regulación post-transcripcional del gen *COQ7* propuesto como uno de los reguladores de la ruta de biosíntesis de la ubiquinona. Nosotros proponemos la presencia de secuencias reguladoras en *cis* en el ARNm de *COQ7* implicadas en la regulación post-transcripcional a través de su unión a proteínas de unión a ARNm. Este trabajo sobre la regulación de los genes *COQs*, estudiados tradicionalmente a nivel transcripcional, aporta información acerca de los mecanismos implicados en la regulación de la síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Nosotros planteamos que la síntesis de ubiquinona debe estar regulada por un mecanismo que integre de una forma coordinada procesos de control transcripcional y post-transcripcional, incluyendo la formación del complejo de síntesis de CoQ<sub>10</sub> regulado a su vez por algunas de las proteínas *COQs* a las que se le atribuyen funciones reguladoras.

## Introducción

Cualquier alteración en algunos de estos procesos, desconocidos hasta el momento, podría ser la causa de los numerosos casos de déficit de CoQ<sub>10</sub> de origen desconocido.

## **Objetivo General**

- ✓ Estudiar la regulación de la biosíntesis del CoQ<sub>10</sub>.

## **Objetivos Específicos**

- ✓ Estudiar la regulación post-transcripcional de COQ7.
- ✓ Identificar las proteínas de unión a ARNm implicadas.
- ✓ Determinar la función de HuR en la expresión de COQ7 y la síntesis de CoQ<sub>10</sub>.



## Resultados

### 1. La región 3'UTR del ARNm de *COQ7* presenta características de AREs y está implicada en la eficiencia de su traducción.

Generalmente la regulación post-transcripcional viene determinada por una variedad de secuencias y estructuras secundarias situadas en las UTR de los ARNm. De esta forma se realizó un análisis del transcrito de *COQ7* y se observó que contenía una 3'UTR de gran tamaño (1939 pb) y rica en nucleótidos de adenina y uracilo, como se observa en la figura 1. Estas dos características son comunes entre los ARNm dianas de RBPs de unión a ARE.

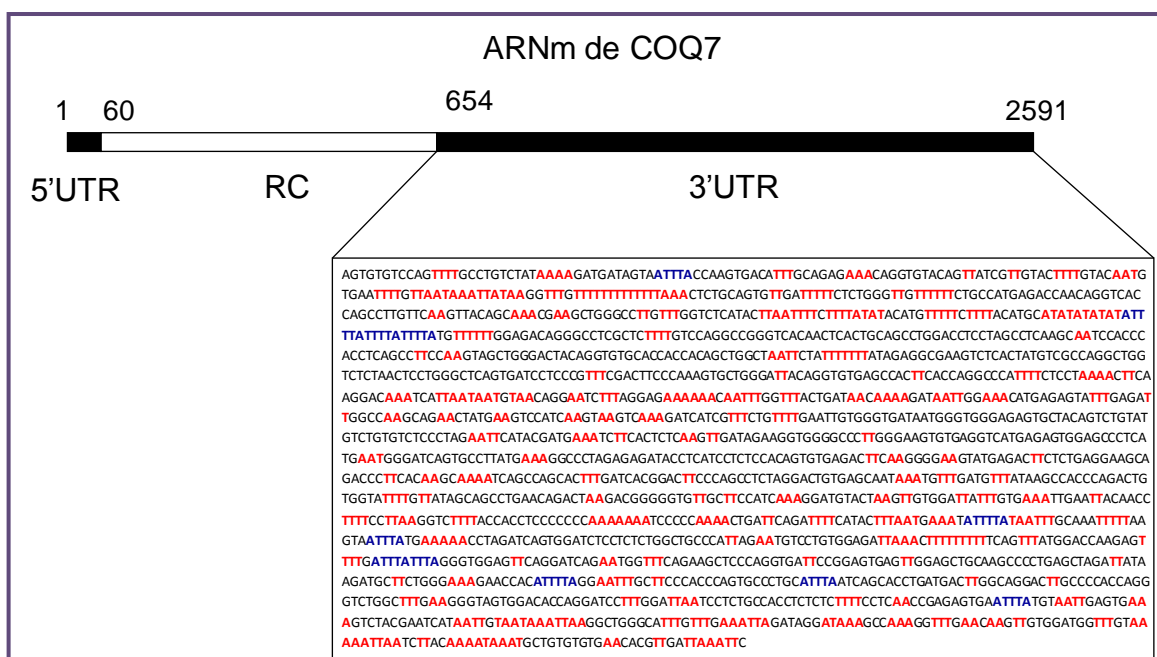
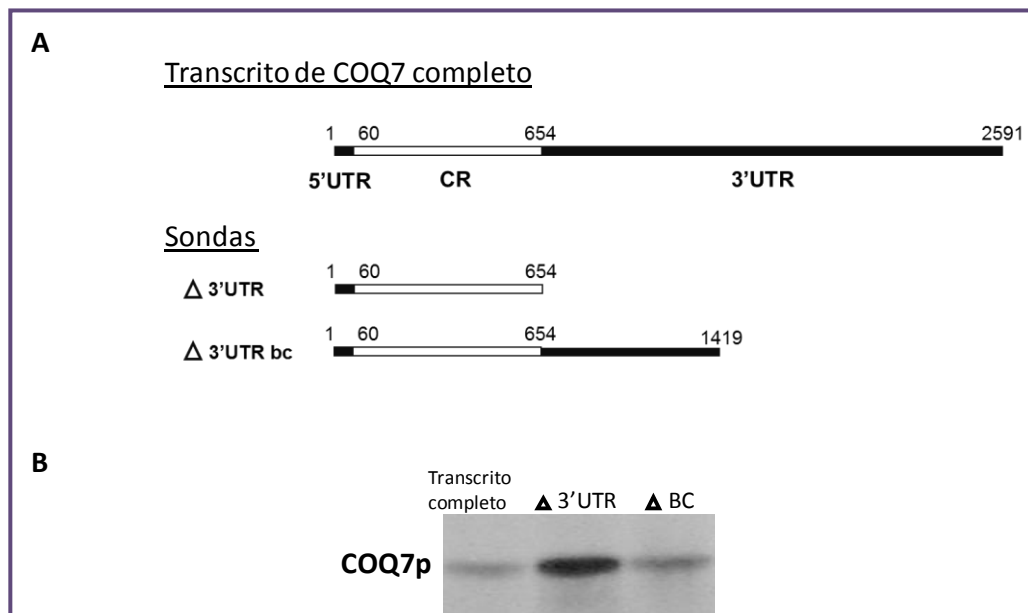


Figura 1: Esquema del transcrito de *COQ7* y su 3'UTR rico en A y U. En azul se indican las secuencias ATTTA y ATTTTA típicas de regiones ARE. RC, región codificante de 594 pb y 5'UTR de 60 pb.

Con el fin de investigar si la 3'UTR del ARNm de *COQ7* interviene en su regulación post-transcripcional, se realizó un estudio de eficiencia traduccional a partir de las ribosondas representadas en la figura 2 (ver materiales y métodos). Este análisis también permitió caracterizar y mapear las secuencias dentro de la 3'UTR de *COQ7* implicadas en este mecanismo de regulación. Una vez sintetizadas las sondas de ARN, mediante transcripción *in vitro* a partir de ADNc, éstas se sometieron a traducción *in vitro* a través de un sistema de traducción en lisado de reticulocitos (ver materiales y métodos). Este sistema contiene toda la maquinaria necesaria para la traducción, a excepción de proteínas de unión a ARNm. En las reacciones de traducción se incluyó metionina radiactiva para el marcaje de la proteína sintetizada. Finalmente los niveles de *COQ7* traducido fueron analizados por

## Resultados

electroforesis y detectados por autorradiografía (ver materiales y métodos). El resultado, mostrado en la figura 2, fue que la eliminación del 3'UTR completo inducía una mayor eficiencia de traducción del ARNm de *COQ7*. En cambio, la ausencia de las últimas 1.172 pb del 3'UTR resultaba en un nivel de traducción similar al observado para el transcrito completo, sugiriendo que en la región comprendida entre las primeras 1.419 pb del 3'UTR se localizaban posibles secuencias de desestabilización o inhibición de la traducción del ARNm de *COQ7*. En la figura 2 se puede observar que el transcrito completo de *COQ7* no se traduce, *in vitro*, a unos niveles demasiado elevados, lo cual apoya la idea de que, en condiciones normales, la presencia de secuencias en cis localizadas en el 3'UTR interviene en la eficiencia de la traducción de *COQ7*.



**Figura 2:** Representación del ARNm de *COQ7* (5'UTR, RC y 3'UTR). A) Sondas de ARNm de *COQ7*,  $\Delta$ 3'UTR: delección de las 1937 pb del 3'UTR;  $\Delta$  3'UTR bc: delección de 1.172 pb del extremo 3' del 3'UTR. B) Niveles de *COQ7* marcado con metionina radiactiva, traducido a través de un sistema de lisado de reticulocitos, a partir de las sondas construidas.

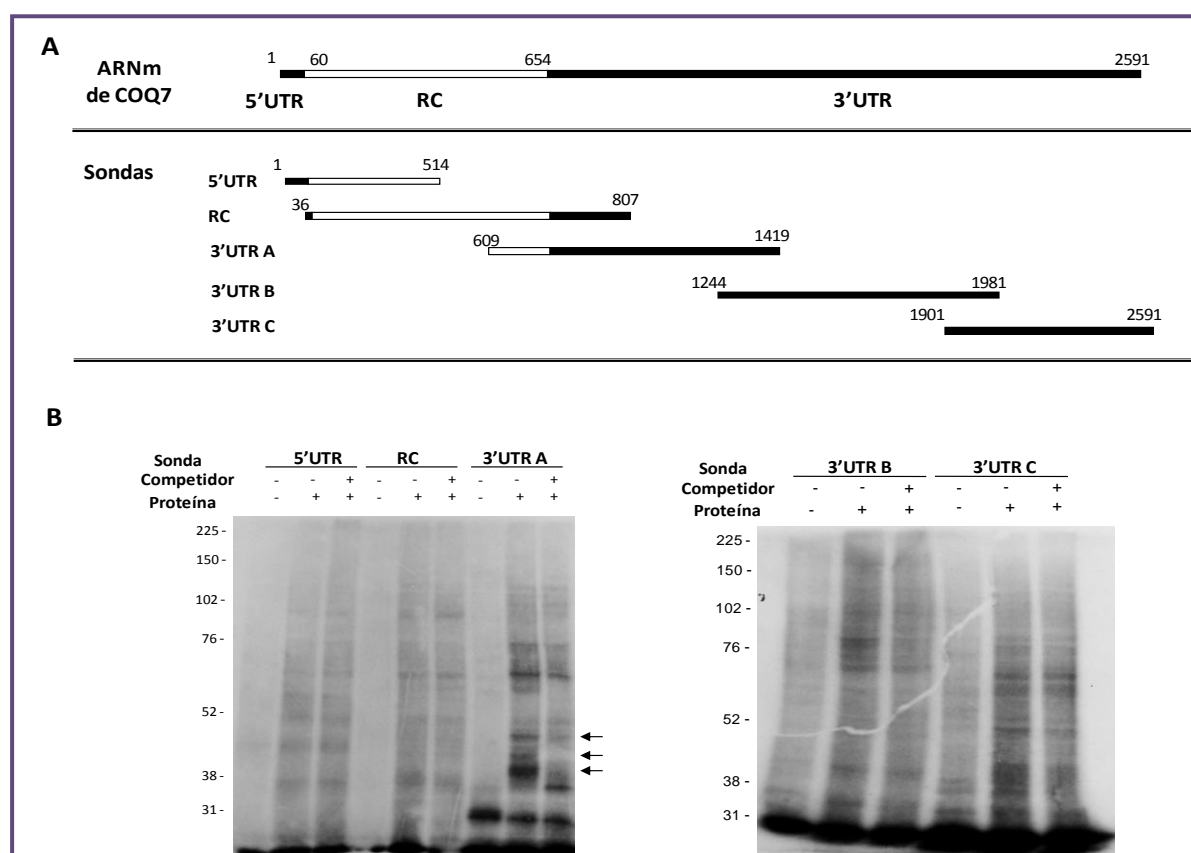
## 2. El 3'UTR de *COQ7* es diana de varias proteínas de unión a ARNm.

Generalmente la regulación post-transcripcional viene determinada por una variedad de secuencias y estructuras secundarias situadas en las UTR de los ARNm. Estos mecanismos reguladores de la expresión génica están gobernados por proteínas de unión a ARNm (RBPs) que controlan todos los aspectos relacionados con el metabolismo del ARNm como se ha explicado en la introducción de esta tesis.

Dada la relevancia para el estudio de la regulación post-transcripcional de *COQ7*, del conocimiento de las RBPs unidas a su ARNm, nos dispusimos a analizar la unión del

## Resultados

transcrito de COQ7 a proteínas celulares. Para ello, construimos varias sondas de ARN a partir de cDNA de células HeLa (ver materiales y métodos) que abarcaban todo el transcrito de COQ7 y se marcaron con  $P^{32}$ . Las sondas se incubaron con un extracto de proteínas citoplasmáticas (mirar si es total o no) y se sometieron a UV-crosslinking, así los complejos RNP permanecen unidos de forma covalente durante el ensayo. Para comprobar la especificidad de las interacciones, se incluyó en el estudio un análisis de competición, mediante una incubación con exceso de sonda sin marcar previo a la incubación con la sonda radiactiva. Finalmente, los complejos RNP compuestos por RBPs individuales o por complejos de proteínas unidas al ARNm de COQ7, se visualizaron por electroforesis SDS-PAGE y fueron detectados por autorradiografía. Como se puede observar en la figura, la sonda 3'UTRa, que se corresponde con la región comprendida entre las últimas 50 pb de la región codificante y las primeras 1419 pb de la 3'UTR, es la única en la que se observan bandas correspondientes a proteínas o complejos de proteínas unidos de forma específica a esta sonda, como sugiere la desaparición de las bandas al incluir el competidor en el ensayo.



**Figura 3: Identificación de proteínas celulares unidas al ARNm de COQ7. A)** Esquema del ARNm de COQ7 completo y de las sondas de ARNm fabricadas desde cDNA de células HeLa. El primer sense utilizado introducía la secuencia de unión de la T7 polimerasa en el extremo 5' de cada sonda, las cuales fueron marcadas con  $P^{32}$  (Ver materiales y métodos). Cada sonda fue

## Resultados

incubada con un extracto celular procedente de células HeLa y se sometieron a UV-crosslinking para mantener los complejos RNP, posteriormente se trataron con Rnase T1 para eliminar el resto de sonda libre. **B)** Electroforesis SDS-12.5 % PAGE de complejos RNP formados por las sondas de ARNm de COQ7 y proteínas celulares. Para el ensayo de competición se incubó un exceso de sonda sin marcar con el extracto celular previo a la incubación con las sondas marcadas.

Este resultado anterior muestra la existencia de varias RPBs o complejos de proteínas unidas a la 3'UTR del ARNm de COQ7, sugiriendo la posibilidad de la formación de complejos de RNP compuestos por varias RBPs unidas al ARNm de COQ7.

### 3. HuR y hnRNP C1/C2 interaccionan con el ARNm de COQ7.

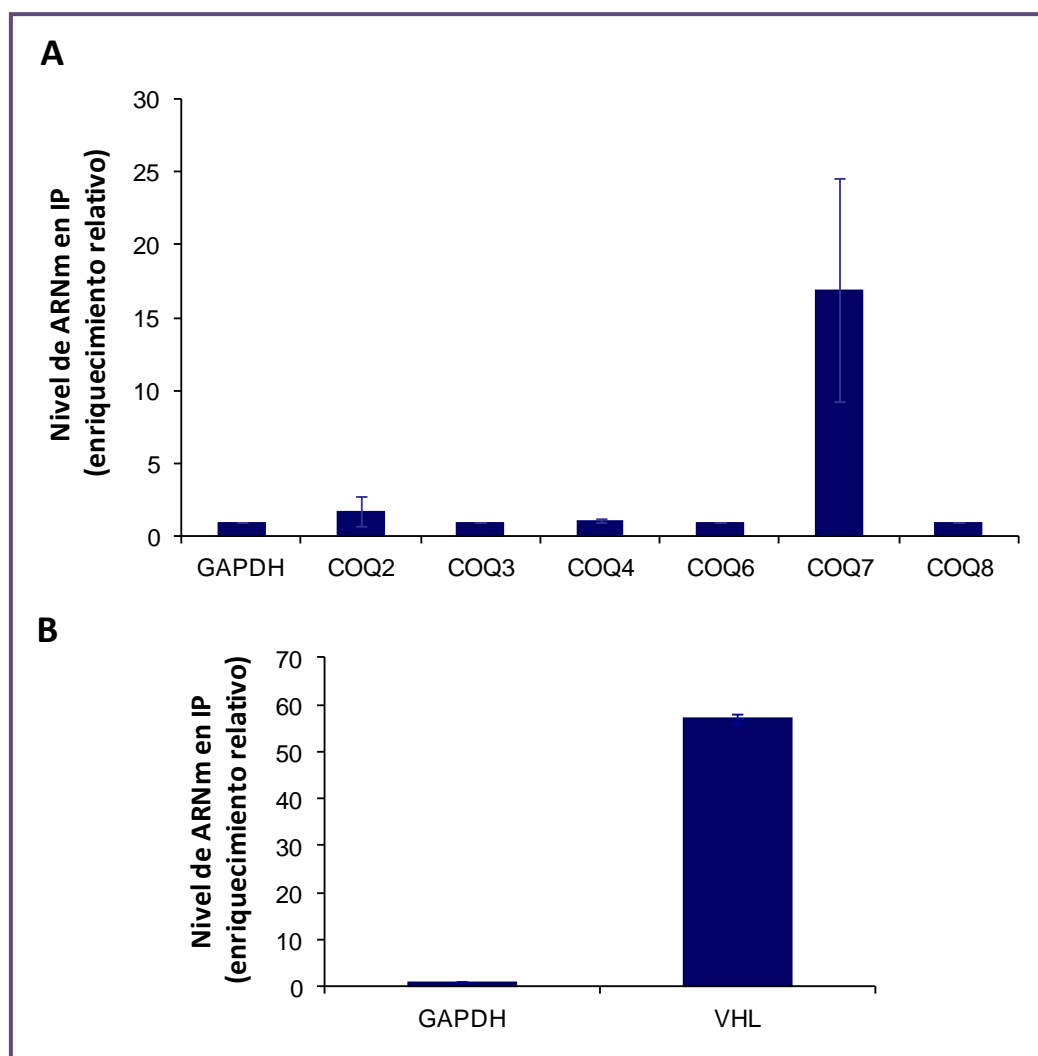
Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, la mayoría de los procesos implicados en la regulación post-transcripcional de la expresión génica están gobernados por proteínas de unión a ARNm (RBPs), las cuales a través de su unión específica a los transcritos diana regulan numerosos aspectos relacionados con su metabolismo, que van desde la estabilidad, procesamiento, transporte, localización y su traducción a proteína.

Una de las RBPs mejor conocidas y más ampliamente estudiadas es HuR. Así en 2004 se publicó un microarray en el que se mostraban los ARNm dianas de la proteína HuR (López De Silanes, Zhan, Lal, Yang, & Gorospe, 2004) y el ARNm de COQ7 aparecía como una posible diana de unión a esta RBP. Con estos indicios se llevó a cabo un análisis informático de todos los genes COQs en humanos, para identificar otras posibles dianas de HuR entre los transcritos de genes de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> usando la base de datos publicada a partir de este estudio de 2004. Entre los potenciales candidatos aparecieron COQ3, COQ4, COQ6 y COQ7.

Con el objetivo de comprobar si el ARNm de COQ7 interacciona directamente con HuR, se realizó una inmunoprecipitación bajo condiciones adecuadas que evitaran la degradación de complejos ARN-proteínas. Para ello un extracto citoplásmico de células HeLa se incubó con un anticuerpo contra HuR. Se usó este tipo celular debido a la gran cantidad de material necesario en esta técnica. Posteriormente se aisló el ARNm unido a HuR y se analizó por PCR en tiempo real (Ver materiales y métodos). El bajo nivel de ARNm de GAPDH encontrado se considera como el nivel de contaminación en todas las muestras inmunoprecipitadas, y se analizó para normalizar los niveles de ARNm utilizados en el análisis. Como control negativo usamos un anticuerpo anti-IgG. Así en la figura 4, se representa el enriquecimiento de los ARNm de los genes COQs unido a HuR en comparación

## Resultados

con la abundancia de transcritos unidos a IgG y podemos observar como la fracción inmunoprecipitada con anti-HuR está unas 16 veces enriquecida en el ARNm de COQ7 con respecto a al nivel de ARNm de GAPDH. Como control positivo se analizó el ARNm del gen VHL, descrito como diana de HuR, así puede observarse en la figura 4 el nivel de enriquecimiento en el transcrito de este gen.



**Figura 4: Unión de los ARNm de genes COQs a la proteína HuR.** El ARNm unido a HuR endógeno es aislado y analizado por PCR en tiempo real a partir de los RNP obtenidos por IP desde extractos citoplásmicos de células HeLa incubadas con anti-HuR y anti IgG. A; Enriquecimiento de los transcritos de los genes COQs en la fracción inmunoprecipitada con anti-HuR relativo al inmunoprecipitado con anti-IgG. B; Niveles de ARNm del gen VHL inmunoprecipitado con anti-HuR relativo al inmunoprecipitado con anti-IgG. Los datos representan la media  $\pm$  DS de cinco experimentos diferentes.

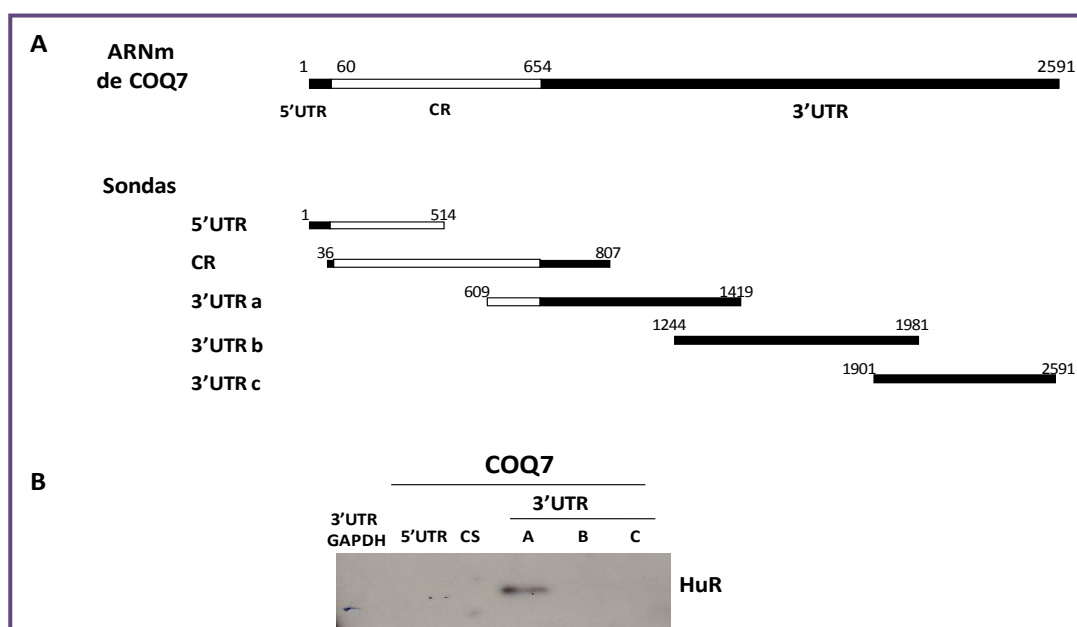
## Resultados

### 3.1 HuR se une a una región proximal del 3'UTR del ARNm de *COQ7*

El siguiente objetivo propuesto fue mapear la región del ARNm de *COQ7* que interacciona con HuR, el cual fue abordado mediante un ensayo de “Biotin-pulldown”.

De nuevo se utilizaron sondas de ARN fabricadas desde cDNA de células HeLa, usando primers específicos para amplificar determinadas regiones del transcrito de *COQ7*, como se indica en la figura 5. Las sondas fueron transcritas in vitro y marcadas con biotina (ver materiales y métodos) y posteriormente cada una fue incubada con un extracto total de proteínas de células HeLa en condiciones que mantenían la integridad del ARNm y de los complejos RNP. Tras la incubación, las sondas marcadas fueron arrastradas a través de su unión con streptavidina (ver materiales y métodos) y su interacción con determinadas RBPs se comprobó por western blotting usando un anticuerpo específico contra HuR. El 3'UTR de GAPDH se usó como control negativo al no ser diana de esta proteína.

Este resultado confirma, como se puede observar en la figura 5, la unión de HuR a la sonda 3'UTRa correspondiente la región comprendida entre las últimas 50 pb de la CS y las primeras 765 pb de la 3'UTR de *COQ7*, confirmando así que el ARNm de *COQ7* es diana directa de HuR.



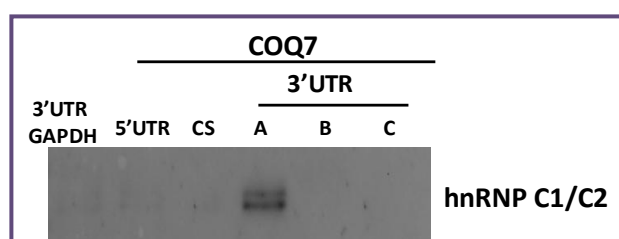
**Figura 5: Biotin pull-down.** A) Esquema de las sondas de ARN marcadas con biotina usadas en el ensayo. Tras la incubación de las sondas marcadas con un extracto total de proteínas de células HeLa, los complejos RNPs marcados fueron arrastrados por estreptavidina y la presencia de HuR unida a cada sonda se ensayó por western blotting. Este análisis se repitió tres veces, con el mismo resultado.

## Resultados

### 3.2 hnRNP C1/C2 es otra RBP capaz de interaccionar con el ARNm de *COQ7*.

Con el propósito de identificar qué otras proteínas aparecen unidas al ARNm de *COQ7* se llevó a cabo de nuevo un experimento de “biotin pull-down”. Se utilizaron las mismas sondas de ARN marcadas con biotina (ver materiales y métodos) usadas para la identificación de HuR mediante esta misma técnica y que englobaban todo el transcrito de *COQ7*. Las sondas mostradas en la figura 5 A se incubaron con un extracto total de proteínas de células HeLa. Los complejos formados por RBPs y las sondas marcadas se aislaron mediante su interacción a estreptavidina. Las proteínas unidas a cada sonda se identificaron mediante western-blotting usando anticuerpos específicos contra varias RBPs (ver materiales y métodos).

Como se observa en la figura 6, hnRNP C1/C2 aparece unida a la sonda 3'UTRa, correspondiente a la región proximal del 3'UTR del ARNm de *COQ7*.



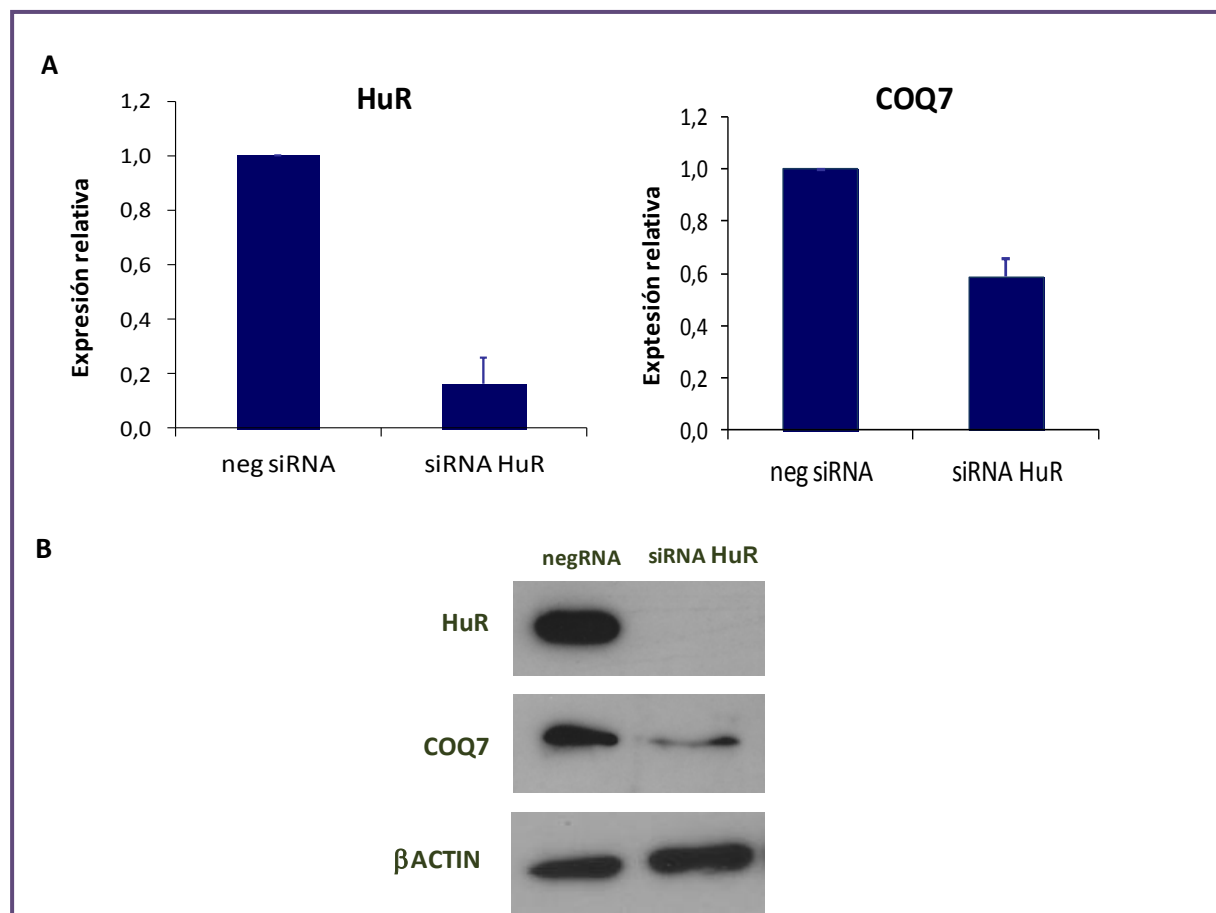
**Figura 6:** Tras la incubación de las sondas biotiniladas con un extracto total de proteínas de células HeLa, los complejos RNPs biotinilados fueron arrastrados por estreptavidina y la presencia de hnRNP C1/C2 unida a cada sonda se ensayó por western blotting. Este análisis se repitió tres veces, con el mismo resultado.

### 4. HuR está implicado en la regulación de la expresión de *COQ7*.

Para estudiar el significado funcional de la interacción de HuR y el ARNm de *COQ7*, los niveles de HuR fueron reducidos mediante ARN interferencia. Para lo cual se transfectaron células MRC-5 con una mezcla de oligos de (si)RNA interferentes específicos para HuR (ver materiales y métodos). Tras el silenciamiento, el ARNm fue aislado y los niveles de expresión se analizaron por PCR en tiempo real (ver materiales y métodos). Como se muestra en la figura 7 la expresión del ARNm de HuR se redujo aproximadamente un 80% con respecto al control negativo para el silenciamiento. Esta disminución en los niveles de HuR inducía una reducción de aproximadamente un 50% del nivel de ARNm de *COQ7* en relación a las células control, como se observa en la figura 7. Los niveles de proteína *COQ7* fueron analizados, con el fin de comprobar si la reducción de HuR tiene efecto en la

## Resultados

traducción de esta proteína. Como se ve en la figura 6B, las células con HuR reducido mostraban una disminución en los niveles de proteína COQ7. La cantidad de proteína se analizó por western blotting (ver materiales y métodos) usando anticuerpos específicos.



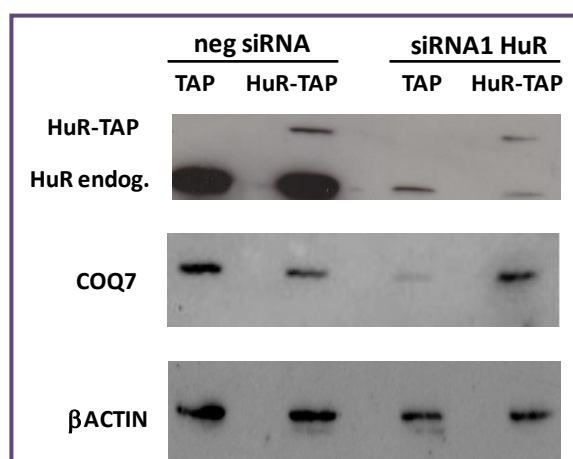
**Figura 7: Transfección de células MRC5 con oligos de ARN interferencia específicos para HuR** (ver materiales y métodos), las células se recogieron a las 48 h de transfección y posteriormente se analizó el nivel de expresión de HuR y COQ7, así como los niveles de proteína. A) Niveles de ARNm de HuR y COQ7 analizados por PCR en tiempo real, tras la purificación del ARN de las células transfectadas. Los datos representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos diferentes. B) Niveles de proteínas de HuR y COQ7 analizados por western blotting. El control de carga se llevó a cabo a través del uso de un anticuerpo específico contra la proteína constitutiva  $\beta$ ACTINA.

Posteriormente se planteó la idea de comprobar si la disminución en los niveles de ARNm y de proteína COQ7 se debió específicamente a la reducción de la expresión de HuR. Con esta finalidad se realizó un experimento de rescate. Tras el silenciamiento de HuR usando un siRNA dirigido a su 3'UTR (siRNA1), las células MRC-5 se transfectaron con una proteína quimérica (HUR-TAP), que está desprovista de su 3'UTR, de forma que no puede ser silenciada por el siRNA utilizado en el ensayo (ver materiales y métodos). Las células se recogieron y a partir de un extracto total se analizaron los niveles de proteínas por western



## Resultados

blotting, utilizando anticuerpos específicos. En la figura 8 se observa como la reducción en la cantidad de HuR endógeno implica una disminución en la proteína COQ7, cuyo nivel es restaurado tras la expresión de HuR-TAP. Este resultado indica que el efecto que HuR ejerce sobre la estabilidad y/o traducción de COQ7 es específico de esta RBP. HuR es predominantemente nuclear, aunque su función la ejerce en el citoplasma. El contenido de HuR endógeno mostrado en este resultado corresponde en su mayor parte al núcleo celular, mientras que la proteína quimérica HuR-TAP se localiza en el citoplasma, donde ejerce su función sobre sus dianas. En la figura 8 se puede observar que la cantidad de HuR-TAP es suficiente para la recuperación de los niveles de COQ7.



**Figura 8: Rescate de la expresión de HuR.** Tras 48 h de silenciamiento, las células MRC-5 se transfectaron con un vector vacío (TAP) y un vector que expresaba la proteína quimérica HuR-TAP, desprovista de su 3'UTR por lo que no puede ser silenciada por siHuR1 (específico de la 3'UTR de HuR). Las células silenciadas y transfectadas con el vector vacío (siHuR1 TAP) muestran una disminución de la proteína COQ7, niveles que se recuperan con la expresión de la proteína quimérica HUR-TAP (siHuR1 TAP-HuR). Este experimento ha sido repetido 3 veces con el mismo resultado.

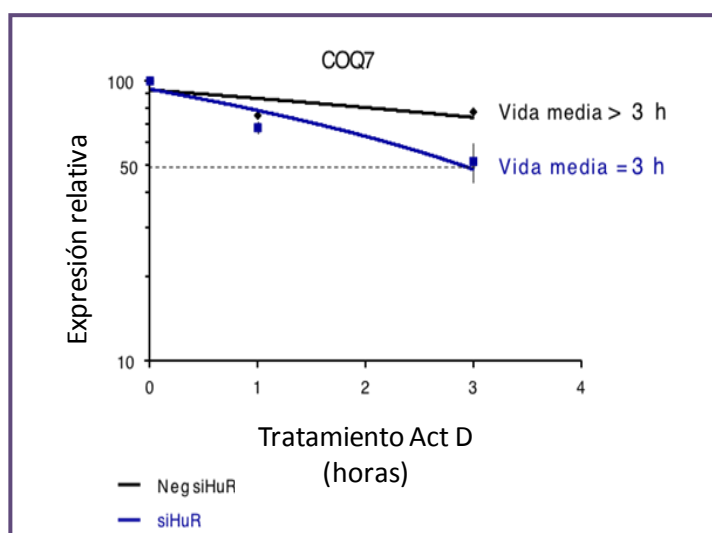
### 4.1 HuR estabiliza el ARNm de COQ7.

Estos resultados indican que tanto la expresión del ARNm como de la proteína COQ7 se ve afectada por una reducción en los niveles de HuR, apoyando la idea de la participación de esta RBP en la regulación post-transcripcional del gen *COQ7*.

HuR se ha descrito como una RBP que interacciona de forma específica con numerosos ARNm diana regulando su estabilidad y/o traducción. Con el objetivo de comprobar si la influencia que HuR ejerce sobre los niveles de ARN y proteína de COQ7 tiene lugar a través de la regulación de la estabilidad de su ARNm realizamos un estudio de la vida media de su transcrito en células MRC-5. De forma que una vez reducidos los niveles de HuR

## Resultados

por ARN interferencia (ver materiales y métodos) las células se incubaron con Actinomicina D, droga que inhibe el proceso de transcripción *de novo*. Tras las 48 h de silenciamiento se recogieron las células a distintos tiempos de incubación con la droga. Posteriormente el ARNm fue aislado y el nivel de expresión se analizó por PCR en tiempo real. Así se estudió el tiempo al cual la cantidad de ARNm de COQ7 disminuyó al 50% de su nivel inicial, estableciendo así su vida media en células silenciadas en HuR con respecto a células control. El resultado, como se muestra la figura 9, fue que mientras las células con niveles de HuR reducidos presentaban una vida media de aproximadamente 3 h, las células control tenían una vida media mayor de 3 horas. Pudimos concluir así que HuR estabiliza el ARNm de COQ7.



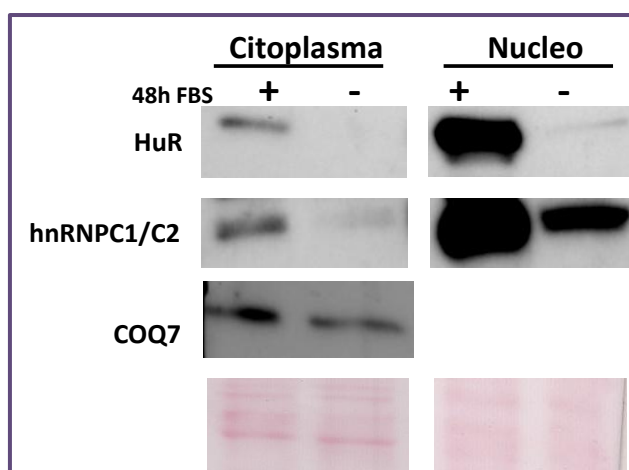
**Figura 9: Silenciamiento de HuR y estudio de la estabilidad del ARNm de COQ7.** Tras 48 h de silenciamiento, las células MRC-5 se incubaron con Actinomicina D a una concentración final de 6  $\mu\text{g/ml}$ . Las células se recogieron en los tiempos indicados y el ARNm se purificó para analizar por PCR en tiempo real el nivel de ARNm de COQ7. Para normalizar se utilizaron los primers para el ARNr 18S. La estabilidad del transcrito se determinó analizando el tiempo necesario para que el ARNm de COQ7 se degradara un 50%. Los datos representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos diferentes.

### 5. El descenso de la expresión de HuR y hnRNP C1/C2 en ausencia de suero correlaciona con una disminución de los niveles de COQ7 y de la tasa de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>.

Está demostrado que en ausencia de suero la expresión de HuR disminuye en células de ratón (Atasoy et al., 1998). Nosotros quisimos comprobar esta bajada en los niveles de HuR en células humanas MRC-5 y estudiar el efecto en la expresión de COQ7 en esta condición fisiológica de reducción de HuR. Para ello, tras 48 horas de cultivo sin suero, se llevó a cabo un fraccionamiento celular y los niveles de cada proteína se analizaron por western blotting,

## Resultados

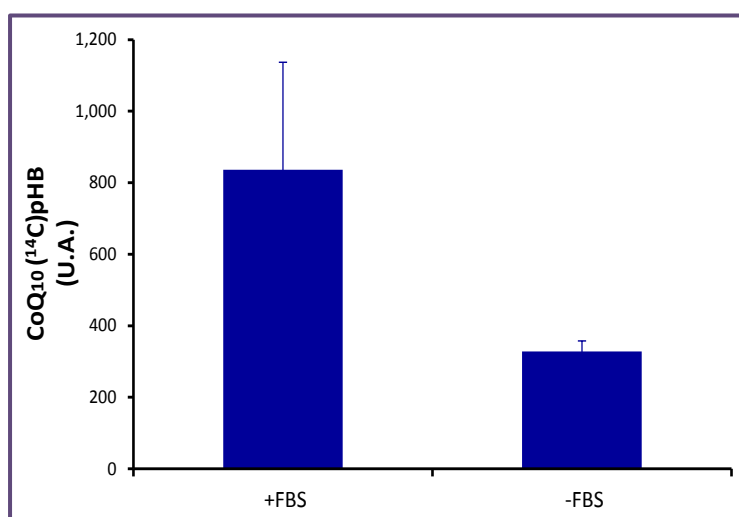
utilizando anticuerpos específicos para cada proteína (ver materiales y métodos). En la figura 10 se comprueba que la cantidad de HuR descendió en ausencia de suero, tanto en la fracción citoplásmica como en la nuclear. Los niveles de la RBP hnRNP C1/C2, que al igual que HuR mostró capacidad de unión al ARNm de *COQ7* (ver apartado 3.2), también bajaron en células cultivadas sin suero. De la misma forma la eliminación del suero también provocó un descenso en la proteína COQ7, pudiéndose concluir que existe una correlación en la expresión de esta proteína COQ y las dos RBP con las que interacciona en ausencia de suero.



**Figura 10: Efecto de la retirada de suero.** Tras la incubación en ausencia o presencia de suero en el medio de cultivo, las células MRC-5 se recogieron y se sometieron a un fraccionamiento celular. Los niveles de COQ7, HuR y hnRNP C1/C2 se analizaron a partir de los extractos citoplásmicos y nucleares, mediante western blotting usando anticuerpos específicos.

Para comprobar si la disminución de la proteína COQ7 en condiciones limitantes de suero afectaba a la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>, se llevó a cabo el análisis de la tasa de incorporación de uno de los precursores marcado con <sup>14</sup>C, en concreto, el primer intermediario de la ruta, (<sup>14</sup>C)pHB. Para ello, después de incubar células MRC-5 durante 48 h con y sin suero, se añadió el (<sup>14</sup>C)pHB durante 24 h, tiempo suficiente para que las células lo incorporen y sinteticen CoQ<sub>10</sub> marcado. Posteriormente se realizó la extracción lipídica a partir de 1.5 mg de proteínas (ver materiales y métodos). El nivel de ubiquinona se determinó mediante cromatografía líquida (HPLC). En la figura 11 se observa la incorporación del precursor radiomarcado descendía en células cultivadas en ausencia de suero, indicando que la velocidad de síntesis de CoQ<sub>10</sub> era menor en células MRC-5 en estas condiciones con respecto al control (+FBS).

## Resultados

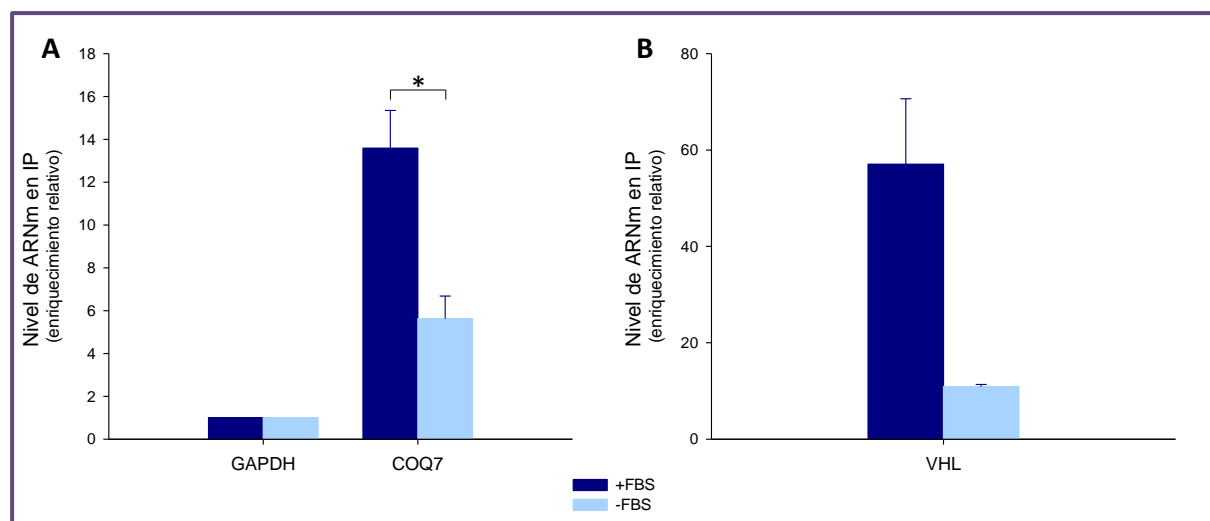


**Figura 11: Tasa de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> en MRC-5.** Las células fueron cultivadas durante 48 h con y sin suero. Posteriormente se añadió el precursor (<sup>14</sup>C)pHB y se realizó una extracción lipídica, partiendo de la misma cantidad de muestra (1.5 mg de proteínas). El nivel de CoQ<sub>10</sub> radiactivo, mediante la incorporación del precursor, se resolvió por cromatografía líquida de alta afinidad. Los datos se representan en cpm, correspondientes a la media de valores por triplicado de un experimento representativo. Los datos representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos diferentes. Tras el análisis realizado las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sin embargo la eliminación del suero causaba un descenso de un 50 % de la incorporación (<sup>14</sup>C)pHB.

### 5.1 La eliminación del suero causa una disminución del ARNm de COQ7 unido a HuR

Con el fin de determinar si HuR estaba directamente implicado en el control de COQ7 en ausencia de suero, se llevó a cabo el estudio del mecanismo molecular en células HeLa debido a la gran cantidad de material necesario. Así para demostrar si la eliminación del suero afectaba a la interacción de HuR al ARNm de *COQ7*, las células se incubaron durante 48 h en presencia y ausencia de suero. Seguidamente se realizó una inmunoprecipitación de complejos ARNm-HuR, usando un anticuerpo específico para esta RBP (ver materiales y métodos), como se describe en el apartado 3. El enriquecimiento de ARNm de *COQ7* presente en la fracción inmunoprecipitada con HuR, se analizó por PCR en tiempo real. Como control negativo se usó una fracción inmunoprecipitada con un anticuerpo contra IgG. Como se muestra en la figura 12, la cantidad de *COQ7* unida a esta RBP era significativamente menor en células crecidas en ausencia de suero.

## Resultados

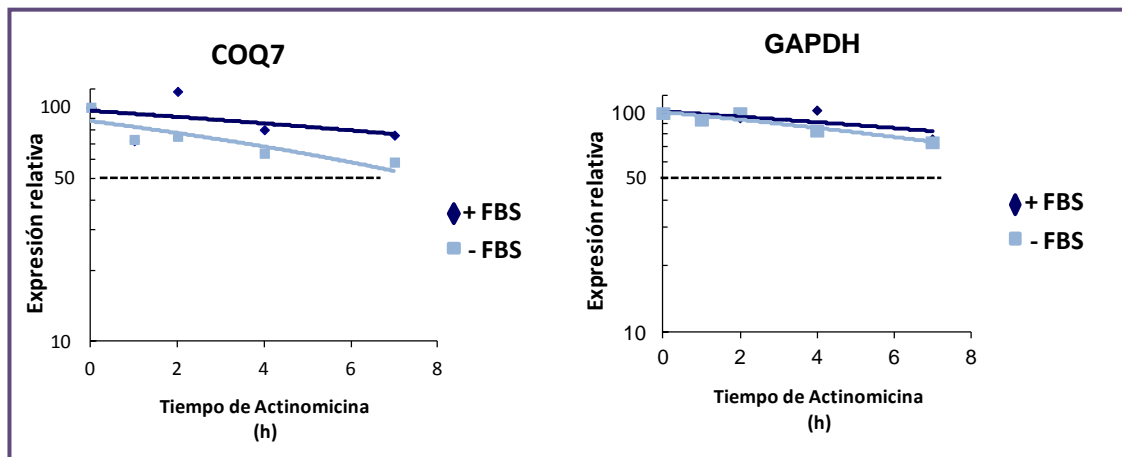


**Figura 12: Inmunoprecipitación de complejos ARNm-HuR.** A) Enriquecimiento en ARNm de *COQ7* relativo al nivel de GAPDH en la fracción inmunoprecipitada con HuR, a partir de un extracto citoplásmico de células HeLa incubadas con y sin suero. B) Niveles de ARNm de VHL, usado como control positivo para la unión a HuR. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  DS de cinco experimentos diferentes. \* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 5.2 La estabilidad del ARNm de *COQ7* es menor en ausencia de suero

Para comprobar si el descenso en la interacción HuR-ARNm de *COQ7* en ausencia de suero generaba una mayor desestabilización del transcrito, se estudió en células HeLa la vida media del ARNm de *COQ7*. Tras el cultivo de las células con y sin suero durante 48 h, se administró Actinomicina D (6  $\mu\text{g/ml}$ ) durante los tiempos indicados en la gráfica 12 para inhibir la transcripción *de novo*. El ARNm fue purificado y la cantidad relativa de *COQ7* se analizó por PCR en tiempo real, estableciéndose así su vida media. En la figura 13 se observa que la eliminación del suero causó un descenso en la estabilidad de *COQ7*, ya que su vida media disminuyó con respecto a las células crecidas en presencia de suero, efecto que no se observó sobre la vida media de *GAPDH* usado como control.

## Resultados



**Figura 13: Estabilidad del ARNm de COQ7 y GAPDH.** Tras la incubación de las células HeLa con y sin suero durante 48 h, las células fueron tratadas con Act D y recogidas a los tiempos a los tiempos indicados. El ARNm fue extraído y la cantidad relativa de los transcritos COQ7 y GAPDH se analizaron por PCR en tiempo real, usando primers específicos para cada uno. Para normalizar se usaron los primers para el ARNr 18S. Los datos respresentados corresponden a la media  $\pm$  DS de tres experimentos diferentes.

### 6. El nivel de expresión de la proteína COQ7 de ratón correlaciona con los niveles de HuR y hnRNP C1/C2 en diferentes etapas de desarrollo y tejidos.

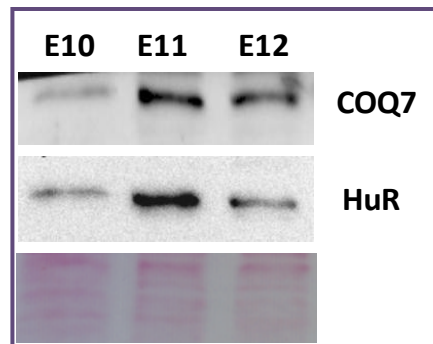
Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran como la expresión de la proteína COQ7 en el pez cebra (*Danio rerio*) varía en diferentes etapas del desarrollo embrionario (datos no publicados). Otros estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, también en nuestro laboratorio y cuyos datos aún no se han publicado revelan que la interferencia del gen *coq7* en un 100% aproximadamente, detiene el desarrollo en el estadio larvario L3 o pupa temprana. Estos resultados apoyan la hipótesis, defendida por algunos autores, de la implicación de esta proteína COQ en procesos relacionados con el desarrollo, así describen que COQ7 es esencial para completar el desarrollo embrionario a partir del estadio E10.5 en ratón.

Por otra parte se ha descrito que la mutación *clk-1/coq7* en *Caenorhabditis elegans* causa un aumento de la esperanza de vida en individuos alimentados en una fuente de CoQ, hecho que no se observa en otros mutantes *coq*. Los análisis hechos en moscas mutantes en *coq7* mostraron que cuando la interferencia no era del 100% los individuos presentaban una mayor esperanza de vida. Todos estos datos sugieren que COQ7 posee una función adicional a la actividad hidroxilasa dentro de la ruta de biosíntesis de CoQ. A partir de estos antecedentes se realizó un estudio en ratón del nivel de expresión de COQ7 en distintas etapas de desarrollo.

## Resultados

### 6.1 Etapa embrionaria

Se tomaron embriones de 10, 11 y 12 días de gestación (E10, E11 y E12 respectivamente) y a partir de un pool de tres embriones se realizó un extracto de proteínas totales (ver materiales y métodos) que fueron sometidas a una electroforesis SDS-PAGE. La cantidad de COQ7 y HuR se analizó por western blotting usando anticuerpos específicos. Como revela la figura 14, se observó un pico de expresión de COQ7 a los 11 días de gestación. Se comprobó además que los niveles de HuR variaban de forma similar a COQ7, mostrando también una mayor en las muestras E11.



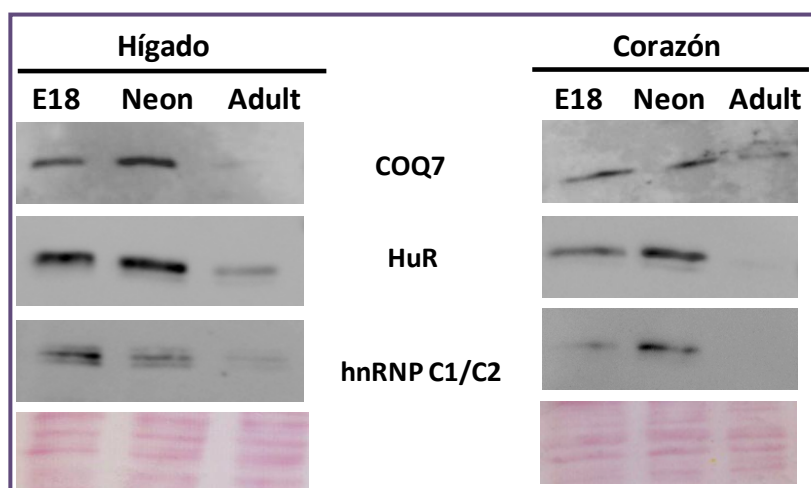
**Figura 14: Expresión de COQ7 y HuR en diferentes etapas de desarrollo embrionario de ratón.** A partir de un homogenado de 3 embriones de 10, 11 y 12 días respectivamente, se realizó un extracto de proteínas totales que se analizaron por western blotting. En los embriones de 11 días se observó una mayor cantidad de ambas proteínas.

### 6.2 Etapa post-embrionaria (hígado y corazón)

Con el objetivo de estudiar la expresión de COQ7 en diferentes etapas post-embrionarias de ratón, se realizó un análisis de la cantidad de esta proteína en ratón, en embriones de 18 días de gestación, neonatos y adultos (cuantos meses?). A partir de un homogenado de individuos en las etapas indicadas, se realizó un extracto de proteína total de hígado y corazón. Los niveles de proteínas se analizaron por western blotting usando anticuerpos específicos. En la figura 15 se comprueba que COQ7 se expresaba más en la etapa embrionaria (18 días de gestación, E18) y neonatal (6 h) que en individuos adultos (18 meses). La cantidad de HuR correlacionaba con el nivel de COQ7, variando de forma similar en los estadios de desarrollo indicados en ambos tejidos. En la siguiente figura se ve además que la proteína hnRNP C1/C2 se expresaba menos en individuos adultos, tanto en hígado como en corazón. Cabría destacar que en el hígado de individuos neonatos se observó una mayor expresión de COQ7 y HuR con respecto a la etapa fetal, mientras que el corazón mostró niveles de HuR y hnRNP C1/C2 superiores durante la etapa neonatal, aumento que

## Resultados

no se correspondió, en este caso, con un incremento en la cantidad de COQ7 en este tejido. Estos resultados sugieren la existencia de una asociación funcional entre COQ7 y las dos RBPs analizadas, asociación que posiblemente sea específica de tejido y varíe también en función de la etapa de desarrollo de un organismo.



**Figura 15: Expresión de COQ7, HuR y hnRNP C1/C2 en diferentes etapas de desarrollo en ratón.** A partir de un homogenado de hígado y corazón de individuos de 18 días de gestación, neonato y adulto, se obtuvieron extractos de proteína total que se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y la cantidad de cada proteína se analizó por western blotting. La expresión de las tres proteínas correlacionaba entre las diferentes etapas analizadas en ambos tejidos. COQ7, HuR y hnRNP C1/C2 se expresaban menos en individuos adultos.



## Discusión

Nosotros hemos demostrado que la proteína COQ7 está regulada post-transcripcionalmente a través de proteínas de unión a ARNm. Este trabajo describe el mecanismo por el cual tiene lugar este proceso de regulación de la expresión de COQ7 en células humanas. Adicionalmente nuestros resultados revelan que la ausencia de factores de crecimiento presentes en el suero, causa un descenso en la tasa de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>, provocado por una bajada en la expresión de COQ7 mediada por RBPs. Así, hemos observado que la 3'UTR del ARNm de COQ7 juega un papel esencial en este proceso, ya que esta región muestra características de AREs, y participa en la regulación de la estabilidad y/o traducción del transcrito. Se ha descrito una secuencia consenso para estas regiones, compuesta por repeticiones del pentanucleótido AUUUA, englobados normalmente en un entorno rico en U (Sachs, 1993). Otra de las características de las 3'UTR que contienen AREs es su gran tamaño. Según nuestros análisis informáticos ambas condiciones están presentes en la 3'UTR de COQ7, la cual presenta tres repeticiones, en este caso de AUUUUA, que están incluidas en una zona rica en U, en concreto una la región proximal de 765 pb de la 3'UTR del ARNm de COQ7. La eficiencia traduccional constituye otro de los aspectos de la regulación post-transcripcional en el que participan secuencias en cis de las UTR. Los elementos que participan en el control de la tasa de traducción se localizan principalmente en la 5'UTR. De tal forma que determinados motivos o estructuras secundarias en esta región son capaces de interferir con el inicio de la traducción. De hecho algunas de estas estructuras son muy estables e impiden una unión efectiva del complejo de iniciación de la traducción (Svoboda and Cara, 2006). Una de estas estructuras secundarias se conoce como IRES (Internal Ribosome Entry Site), las cuales se sitúan normalmente en la 5'UTR y constituyen un mecanismo alternativo para el inicio de la traducción (Mignone et al., 2002). En contraste, se ha observado que la 3'UTR de determinadas proteínas mitocondriales del sistema OXPHOS también pueden estar implicadas en su eficiencia traduccional. Concretamente, la 3'UTR del ARNm que codifica para la  $\beta$ -F1 ATPasa, promueve el inicio de la traducción *in vitro* (Izquierdo and Cuezva, 1997). En este trabajo demuestran que determinados ARNm de proteínas mitocondriales con funciones bioenergéticas, codificadas en el núcleo, presentan secuencias reguladoras de la traducción en sus 3'UTR. En función de nuestros resultados hemos determinado que una región proximal de 765 pb de la 3'UTR de COQ7 contiene secuencias implicadas en el mantenimiento de la eficiencia traduccional a un nivel basal, en un sistema *in vitro* libre de células. Así la eliminación de dicha secuencia del

## Discusión

3'UTR incrementa la tasa de traducción y por tanto el nivel de proteína COQ7 traducida, mientras que la presencia de la 3'UTR completa mantiene la traducción al nivel basal. Estos datos nos llevan a proponer la presencia de motivos o estructuras secundarias en esta región del 3'UTR del ARNm de *COQ7* que podrían interferir en su estabilidad o tasa de traducción. Un estudio realizado en 1994 (Gorospe and Baglioni, 1994) concluyó que una región de la 3'UTR del ARNm de la interleukina 1 $\alpha$  (IL-1), que contiene un cluster de 4 repeticiones del pentámero AUUUA, promueve una mayor inestabilidad y en consecuencia una disminución de la tasa de traducción del transcrito. En contraste se ha demostrado que la presencia de mutaciones en el hexámero AUUUUA, presente en la 3'UTR del receptor AT1 e incluido en una estructura secundaria (stem-loop) del ARNm interrumpen la degradación del transcrito (Berger, Stierkorb and Nickenig 2005).

El conocimiento de los procesos que regulan la expresión de los genes de síntesis del CoQ<sub>10</sub> es limitado, aunque son numerosas las evidencias que indican que deben estar sometidos a varios niveles de control de la expresión génica. La información acerca de la regulación del gen *COQ7* en células humanas se limita a la participación del factor de transcripción NF $\kappa$ B en su regulación transcripcional, y por tanto en los niveles de ubiquinona, en respuesta al estrés causado por el quimioterápico CPT (Brea-Calvo et al., 2009). Nuestro trabajo supone un avance en el conocimiento de la regulación del gen *COQ7* y en consecuencia de la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>, abordando un aspecto hasta ahora apenas estudiado como es el control post-transcripcional de uno de los genes *COQs*.

Otra de las evidencias derivadas de nuestro trabajo es que, en células humanas, el ARNm de *COQ7* es capaz de formar complejos RNP a través de su unión a RBPs, entre las que hemos identificado a HuR y hnRNP C1/C2. La zona de unión a estas proteínas está incluida dentro de una región proximal de 765 pb del 3'UTR del ARNm de *COQ7*. Según nuestras observaciones, un descenso en los niveles de HuR causa la desestabilización del transcrito de *COQ7* y una disminución de la expresión de la proteína, efecto que es específico de HuR como demuestran nuestros resultados, los cuales por primera vez implican a varias RBPs en la regulación post-transcripcional de una de las proteínas de la síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Son numerosos los ARNm, descritos hasta el momento, a los que esta RBP de unión a AREs regula su estabilidad y/o la traducción (Abdelmohsen et al., 2007; Kawai et al., 2006; Lal et al., 2005; Wang et al., 2000; Tiedje et al., 2012. Así, el nivel de expresión de

## Discusión

determinadas proteínas constituye un reflejo de los cambios de estabilidad de su ARNm mediado por HuR, mientras que la tasa de traducción permanece sin cambios (Chen et al., 2002; Ishimaru et al., 2009). Si HuR influye en la tasa de traducción de la proteína COQ7 queda aún por determinar.

Se ha establecido que HuR participa en numerosos aspectos de gran importancia para la célula, como son la respuesta a estrés, la división celular, la respuesta inmune, la carcinogénesis y la senescencia (Srikantan et al., 2012). Habría que destacar el papel de HuR en el metabolismo bioenergético, a través de la regulación post-transcripcional del citocromo c (Kawai et al., 2006). Nuestros datos apoyan la participación de HuR en procesos bioenergéticos mediante de la regulación post-transcripcional de la síntesis de los dos transportadores de electrones móviles de la membrana interna mitocondrial, como son el citocromo c y el CoQ<sub>10</sub>.

Está aceptado que HuR ejerce generalmente una función estabilizante, mientras que otras RBPs como por ejemplo AUF1 desestabiliza a sus ARNm dianas. Así, en la literatura, encontramos varios ejemplos de asociación funcional entre HuR y AUF1 a determinados ARNm específicos, ya sea en la misma región o en zonas distintas del transcrito (Blaxall et al., 2002; Chang et al., 2010; David et al., 2007; Zou et al., 2010). Se ha propuesto que el hecho de que ambas proteínas puedan interaccionar de forma cooperativa o competitiva a un mismo ARNm, responde a varios factores como la concentración de cada RBP, el tipo de estrés, así como el compartimento celular en estudio y el ARNm diana (Barker et al., 2012; Lal et al., 2004; Masuda et al., 2009). Nosotros hemos obtenidos algunas evidencias de que AUF1 se une también al 3'UTR de COQ7 (dato no mostrado), sin embargo se requiere un estudio más profundo en este sentido.

Otra de las RBP identificada en este trabajo y que tiene capacidad de unión a la misma región del 3'UTR de COQ7 que HuR, se denomina hnRNP C1/C2. Se ha demostrado una asociación de cooperación funcional entre hnRNP C1 y HuR, durante el proceso post-transcripcional de corte y empalme del ARN (Izquierdo, 2010; Papadopoulou et al., 2010). Se considera que las proteínas de la familia hnRNP forman el nucleo de los complejos RBP y se encargan de empaquetar los transcritos nacientes o recién sintetizados dentro de partículas de hnRNP. Estas proteínas reclutan a otras proteínas reguladoras de unión a ADN y ARN y

## Discusión

parece que permanecen unidas al transcrito durante toda la vida del ARNm (Gideon et al., 2002).

Los complejos RNP organizados intracelularmente son muy variados en cuanto a composición, la cual es única para cada ARNm, y sus componentes son modificados según las características funcionales de la célula y el transcrito en concreto (Glisovic et al., 2008). Recientemente se están reconociendo una gran cantidad y variedad de RBPs. La identificación de HuR y hnRNP C1/C2 como RBPs unidas al ARNm de *COQ7* abre la puerta al estudio de la asociación funcional de estas RBPs y la formación de complejos RNPs que incluya el ARNm de genes *COQs*, ayudando a desentrañar importantes aspectos de su regulación post-transcripcional, como el transporte desde el núcleo al citoplasma o la localización del transcrito para su traducción a proteína, proceso este último esencial para proteínas implicadas en el desarrollo (Castello et al., 2013; Czaplinski & Singer, 2006; Simone and Keene, 2013). Nuestro trabajo se centra en el estudio del mecanismo por el que HuR interacciona con el ARNm de *COQ7*, en células humanas, así como de las consecuencias fisiológicas de esta asociación sobre la expresión de *COQ7* y la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>.

HuR y hnRNP C1/C2, como la mayoría de las RBPs, son predominantemente nucleares pero la mayoría de ellas pueden intercambiarse al citoplasma (Keene, 1999; Fan and Steitz, 1998). En relación a HuR, son varios los estímulos descritos que modulan su expresión o distribución celular, así como la interacción con sus ARNm dianas. Así por ejemplo, el estrés oxidativo en células HDF (human dermal fibroblast) no afecta el nivel de HuR total, pero modifica su unión a determinados transcritos, promoviéndola en algunos casos y disociándose en otros (Abdelmohsen et al., 2008). Lo mismo ocurre durante la exposición a radiaciones UV y a estrés genotóxico, por citar algunos ejemplos (Lal et al., 2006; Wang, Furneaux, et al., 2000). Estos datos apoyan la hipótesis de que la interacción de HuR a un ARNm diana depende en mayor medida del transcrito que del tipo de estrés. En contraste, se ha observado que en células HDF senescentes la cantidad total de HuR decrece (Wang et al., 2001) hecho que se asocia a una modificación de la expresión de determinados genes relacionados con procesos de proliferación celular y senescencia replicativa. Se ha demostrado además que el nivel de HuR disminuye en fibroblastos de ratón NIH-3T3, mediado por la falta de factores de crecimiento tras la retirada de suero (Atasoy et al., 1998). Según nuestros resultados, en fibroblastos humanos MRC-5 la eliminación del suero

## Discusión

causa un descenso en HuR y también en hnRNP C1/C2, revelando además que la expresión de *COQ7* es menor en ausencia de factores de crecimiento. Se pone así de manifiesto la existencia de una correlación entre el descenso de esta proteína y las dos RBPs con las que hemos observado que tiene capacidad de unión. La tasa de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> disminuye también en condiciones limitantes de suero. Nuestros datos muestran que en células HeLa la eliminación del suero causa un descenso en la interacción de HuR al ARNm de *COQ7*, provocando un aumento de la inestabilidad del transcrito. Podemos concluir así que HuR está implicada en la regulación de la biosíntesis de ubiquinona a través del control post-transcripcional de *COQ7*, mediado por la retirada de suero y sugieren que hnRNP C1/C2 está implicada en el proceso de regulación de *COQ7*. En resumen, la disminución de HuR en ausencia de suero, causa un aumento en la inestabilidad del ARNm de *COQ7* y en consecuencia un descenso en la velocidad de síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Los niveles totales de CoQ<sub>10</sub> (datos no mostrados) no reflejan cambios en condiciones limitantes de suero con respecto a células crecidas en presencia de suero. A este respecto habría que señalar que el CoQ<sub>10</sub> está localizado en múltiples orgánulos intracelulares, desempeñando funciones específicas en función de su localización, así hay investigadores que defienden que la determinación de los niveles totales de este lípido, a partir de un extracto celular estándar, no es adecuado ya que pequeñas diferencias con un importante significado fisiológico o funcional podrían ser enmascaradas (Lapointe et al., 2012). De esta forma consideramos que lo más adecuado para detectar alteraciones en la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> es el análisis de la velocidad de síntesis mediante la incorporación de un precursor radiactivo. En este sentido quedaría por determinar la tasa de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub> en células con niveles reducidos/silenciados y sobreexpresados de HuR. Un estudio realizado por Larsson concluye que en células de ratón 3T6 la eliminación del suero además de provocar un descenso (aunque no una parada total) del ciclo celular, también causa una bajada en la síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Se observa que este efecto es independiente de la actividad de la enzima HMG CoA reductasa, indicando que la ausencia de suero estaría afectando a la síntesis de ubiquinona en algún punto de control aguas abajo a esta enzima (Larsson, 1987).

El papel ejercido por hnRNP C1/C2, así como la identificación de otras RBPs que participen y regulen la dinámica de este complejo RNP, en el que está incluido el ARNm de *COQ7*, son aspectos que no han sido abordados en este trabajo. La actividad y la composición exacta de dichos complejos, y los aspectos concretos que cada RBP regula,

## Discusión

posiblemente dependa del tipo y del compartimento celular, así como del estado funcional o el tipo de estrés al que esté sometido la célula. Probablemente, la composición y dinámica de estos complejos de proteínas asociados al ARNm de *COQ7* o de otros genes *COQs*, sea una de las causas de la variabilidad en el contenido y distribución del CoQ<sub>10</sub> entre diferentes tejidos y organismos estudiados. Dada la existencia de un complejo de biosíntesis de ubiquinona formado por las proteínas COQs y debido a la homología encontrada en estas proteínas en levaduras y humanos, se postula que en este organismo también formarían un complejo multienzimático. Las investigaciones de algunos autores señalan cómo los miembros de un complejo multiproteico muestran cierta correlación en algunos aspectos de la regulación post-transcripcional, por ejemplo la estabilidad o la tasa de degradación de sus ARNm, y proponen que algunas de las proteínas de un mismo complejo pueden tener capacidad de unión y regulación del metabolismo del ARNm de otros componentes de la estructura multiprotéica (Mata et al., 2005). ¿Sería este el caso de algunas de las proteínas COQs, cuya función no se conoce actualmente?. En este sentido un estudio realizado en *S. cerevisiae* en el año 2000 ya propuso que la expresión de la O-metiltransferasa *COQ3* dependía de otros genes *COQs* y que podría estar regulada post-transcripcionalmente. Así describen como cepas mutantes en distintos genes *COQs* presentan niveles de proteína Coq3 reducidos, mientras que la expresión de ARNm no varía (Hsu et al., 2000).

En relación a las deficiencias de CoQ<sub>10</sub>, hasta el momento no se han descrito pacientes que muestren mutaciones en el gen *COQ7*. Por otro lado, existen casos en los que un déficit de ubiquinona no corresponde a mutaciones en los genes *COQs* que codifican para proteínas con actividad enzimática. En los últimos años, han aparecido mutaciones que provocan un descenso en los niveles de CoQ<sub>10</sub>, en genes que codifican para proteínas propuestas como reguladoras de la síntesis de este lípido, aunque su función exacta aún se desconoce (Horvath et al., 2011; B. Marbois et al., 2009; Salviati et al., 2011; Xie et al., 2011). Es importante destacar el avance en el conocimiento de enfermedades asociadas a alteraciones en procesos de regulación post-transcripcional, en concreto patologías promovidas por fallos en determinados aspectos en los que interviene HuR que causan desórdenes neurológicos y musculares, coincidiendo con algunos de los síntomas de pacientes con déficit de CoQ<sub>10</sub> (Abdelmohsen and Gorospe, 2010; Pascale and Govoni, 2011; Srikantan and Gorospe, 2012). A partir de nuestro trabajo surge la idea de que aquéllos

## Discusión

pacientes con alteraciones en los niveles de ubiquinona, sin mutaciones en ninguno de los genes *COQs* conocidos hasta la fecha, presenten algún tipo de desorden en proteínas de unión a ARNm o modificaciones en determinadas zonas reguladoras localizadas en *cis* en las regiones UTRs de sus transcritos. La investigación de estos procesos, y de los elementos que participan en la regulación del CoQ<sub>10</sub>, supondrá un avance en el conocimiento de la deficiencia. Habría que destacar la importancia de estos estudios para el establecimiento de un diagnóstico y el desarrollo de nuevos tratamientos que incluirían la estimulación endógena de la síntesis de ubiquinona.

En relación a una función adicional a la síntesis de ubiquinona propuesta para CLK-1/COQ7, se ha propuesto un modelo que intenta explicar el fenotipo pleiotrópico de la mutación en *C. elegans*. Los autores defienden que la proteína actuaría como un regulador metabólico coordinando la función nuclear y mitocondrial. Establece que en situaciones de escasa disponibilidad de energía o de ATP, CLK-1/COQ7 participaría en la comunicación al núcleo del estado energético mitocondrial, induciéndose así un nuevo patrón de expresión génica acorde con la escasa producción energética. En estados de alta generación de energía mitocondrial, CLK-1/COQ7 coordinaría la implementación de un nuevo patrón de expresión génica, dando como resultado un estado fisiológico activo. En ausencia de esta proteína la comunicación entre mitocondria y núcleo no sería establecida, desregulándose así el patrón de expresión, derivando en el fenotipo de retraso en el desarrollo y enlentecimiento de numerosos comportamientos fisiológicos observado en mutantes *clk-1* (Branicky et al., 2000). Según este modelo, en condiciones celulares de baja energía CLK-1 podría estar reducido, lo cual apoya el descenso de COQ7 mostrado en nuestros resultados. En otro trabajo reciente, se ha demostrado que en células HeLa la proliferación celular se suprime en condiciones de baja producción de ATP mitocondrial, mediado por ciclinas-D que actúan como sensores de factores de crecimiento (Gemin et al., 2005; Xiong et al., 2012). Xiong et al. proponen que diversos estímulos inducen factores de crecimiento, aumentando la expresión de genes mitocondriales y genes relacionados, elevándose así la producción de ATP, factor que desencadenaría eventos de ciclo celular y la proliferación celular. Los autores establecen que la unión entre la mitocondria y el núcleo es desconocida, ¿estaría en este proceso implicada la proteína COQ7?. Nosotros proponemos que la retirada de suero causa la desestabilización de COQ7, mediado por una reducción en los niveles de HuR, causando así el descenso en la tasa de síntesis de CoQ<sub>10</sub>. Sin embargo, a partir de todos estos datos surge

## Discusión

la necesidad de estudiar el fenotipo, viabilidad y crecimiento celular en condiciones de *COQ7* reducido o silenciado en diferentes líneas celulares y profundizar así en el posible papel de *COQ7* en la progresión del ciclo celular, a través de su actividad como coordinador de la actividad mitocondrial y nuclear en función del estado energético celular.

Según los resultados de un estudio cuyo objetivo era analizar la función del gen *CLK1/COQ7* en mamíferos, utilizando ratones deficientes en esta proteína, se observa que los ratones heterocigotos eran viables y no mostraban defectos evidentes, incluso el contenido en Q total era similar al de los ratones silvestres. Sin embargo, los individuos homocigotos no superaban los diez días (E10) de desarrollo embrionario, presentando importantes alteraciones en el desarrollo neural. Como se comentó en la introducción de esta tesis numerosos casos de pacientes humanos con déficit de ubiquinona muestran importantes síntomas neurológicos (Liu et al., 2005; Nakai et al., 2001). Otro trabajo realizado en ratas concluyó que la membrana interna de la mitocondria completa su desarrollo entre el E10-E12, apoyando el hecho de que en embriones de rata, la generación de energía pasa de llevarse a cabo por glicolisis anaeróbica a glicolisis aeróbica entre el E10-E12 (Shepard et al., 2000). Con estos datos, estos autores postulan que los embriones homocigotos para la mutación se desarrollan hasta E8 basándose en un metabolismo anaeróbico. En cambio, no pueden completar su desarrollo debido a la incapacidad de realizar glicolisis aeróbica, necesaria para el desarrollo embrionario posterior. Estas investigaciones junto con los estudios realizados en *C. elegans* mutantes en *clk-1*, apoyan la hipótesis de que la proteína *CLK-1/COQ7*, además de su función como hidroxilasa del *CoQ<sub>10</sub>*, está implicada en procesos de desarrollo (Wong et al., 1995; Jonassen et al., 2001; Larsen and Clarke, 2002; Nakai et al., 2001). Como ya se ha comentado, su ausencia provocaría la desregulación de procesos esenciales durante el desarrollo.

Partiendo de estos antecedentes, nos planteamos el estudio de los niveles de la proteína *COQ7* durante el desarrollo embrionario y post-embrionario en ratones, así como de las RBPs *HuR* y *hnRNP C1/C2*. El papel que las RBPs ejercen durante el desarrollo no se conoce en detalle, sin embargo en el año 2000 se llevó a cabo un estudio del patrón de expresión de *HuR* y *AUF1* en diferentes etapas y tejidos de ratón y observaron que existía una correlación en los niveles de expresión tanto de ARNm como de proteína *HuR* y *AUF1* entre las distintas etapas embrionarias y tejidos analizados (Gouble and Morello, 2000). Los



## Discusión

autores de este trabajo sugieren que ambas RBPs actúan en procesos comunes dada la correlación espacio-temporal observada. En relación a hnRNP C1/C2 un estudio muestra como esta RBP juega un papel esencial durante el desarrollo embrionario de ratón, aunque aún no haya sido determinado con precisión (Kamma et al, 1995; Williamson et al., 2000).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que en ratones, el nivel de expresión de la proteína COQ7 varía en diferentes etapas del desarrollo embrionario y post-embrionario y que estas variaciones correlacionan con cambios en HuR y hnRNP C1/C2. Así, durante la etapa embrionaria, hemos demostrado que a los 11 días de gestación se produce una mayor expresión de COQ7 y HuR. Adicionalmente, en nuestro laboratorio disponemos de resultados obtenidos en pez cebra, que muestran que la traducción de esta proteína aumenta a las 48 h de desarrollo embrionario. La duración del desarrollo embrionario en este organismo es de 72 h. En relación a la etapa post-embrionaria, nuestros análisis revelan que COQ7 desciende en ratones adultos con respecto a la etapa embrionaria E18 y neonatal. Esta bajada coincide con una disminución en HuR y hnRNP C1/C2. Estos datos apoyan la hipótesis de que COQ7, además de su actividad en la ruta de síntesis de CoQ<sub>10</sub>, desempeña otras funciones implicadas en el desarrollo. Otros resultados que aún no han sido publicados y que avalan este papel de COQ7 se han obtenido también en nuestro laboratorio, concretamente en *Drosophila m.* En resumen, las moscas interferidas en el gen *COQ7* (100% de interferencia aprox.) no superan el desarrollo embrionario más allá del estadio de larva L3, presentando además un déficit de CoQ<sub>10</sub> bastante importante. En cambio se ha observado que cuando la interferencia no es completa y se expresa COQ7, aunque a niveles más bajos (coincidiendo con un menor contenido en ubiquinona), la supervivencia de las moscas aumenta con respecto al silvestre (datos no mostrados). Se ha propuesto que la extensión de la esperanza de vida depende del grado de disminución de los niveles de CoQ<sub>10</sub> y de las diferentes isoformas presentes desde la biosíntesis endógena y la dieta exógena (Lapointe and Hekimi, 2008; López-Lluch et al., 2010). Hasta el momento no hemos profundizado en el estudio de la interacción del ARNm de *COQ7* a HuR y hnRNP C1/C2 durante el desarrollo, sin embargo nuestros resultados sugieren una posible asociación funcional y plantean la necesidad de un análisis exhaustivo de la función que las RBPs ejercen sobre *COQ7* y la síntesis de ubiquinona durante el desarrollo embrionario y post-embrionario. Cell type-specific expression of hnRNP proteins

## Discusión

En este sentido, se ha demostrado que la proteína  $\beta$ -F1-ATPase, integrante del complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial se regula a nivel post-transcripcional en determinadas etapas del desarrollo (Izquierdo and Cuezva, 1997; Izquierdo et al., 1995; Luis et al., 1993). Estos autores describen un incremento en la expresión de esta proteína en hígado de rata, simultáneo al aumento de la tasa de síntesis de proteínas citosólicas y sobre todo mitocondriales, producido en la etapa post-natal y demuestran como este efecto se debe a una activación de la fase de iniciación de la traducción. Adicionalmente comprueban como la estabilidad del *ARNm de la*  $\beta$ -F1-ATPase es menor en individuos adultos en relación con la etapa fetal (Izquierdo et al., 1995)(Izquierdo JM et al., 1995). Nuestros resultados apoyan este hecho ya que muestran un aumento de la proteína COQ7 y las RBPs en el hígado de ratón durante la etapa neonatal. En la literatura podemos encontrar otros ejemplos de proteínas mitocondriales, y en particular del sistema OXPHOS, sometidas a regulación post-transcripcional por RBPs a través de su unión a la 5' ó 3'UTR de sus ARNm (Izquierdo, 2006; Kawai et al., 2006; Ortega et al., 2010).

Nuestro trabajo apoya la idea de la existencia de varios los niveles de regulación implicados en la biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>. Uno de estos puntos de control y según demuestran nuestros resultados es el control post-transcripcional de uno de los genes COQ, en concreto *COQ7*, a través de la formación de complejos de RNP. La unión específica de RBPs al 3'UTR del ARNm aportaría precisión al mecanismo de regulación de *COQ7* y de la biosíntesis de ubiquinona. Este proceso permitiría modular de una forma rápida y efectiva los niveles de expresión, adaptándolos a las necesidades específicas de COQ7 y de CoQ<sub>10</sub> en función de diferentes estímulos. Nuestro trabajo aborda por primera vez el estudio, en distintas etapas del desarrollo de ratón, de los niveles de una de las proteínas COQs propuesta a su vez como regulador de la ruta de síntesis de CoQ<sub>10</sub> y regulador metabólico y aportamos evidencias de que los cambios de COQ7 observados podrían estar regulados a nivel post-transcripcional, a través de la unión a RBPs.

### Conclusiones

1. En células humanas, el 3'UTR del ARNm de *COQ7* contiene motivos o estructuras secundarias implicadas en su regulación post-transcripcional.
2. El 3'UTR del ARNm de *COQ7* humano se asocia a varias RBPs, entre las que se encuentran HuR y hnRNP C1/C2.
3. Los sitios de unión de HuR y hnRNP C1/C2 se localizan en una región proximal del 3'UTR de *COQ7*.
4. HuR estabiliza el ARNm de *COQ7*, induciendo así su traducción.
5. En condiciones limitantes de suero, HuR desestabiliza el ARNm de *COQ7*, causando una disminución en el nivel de proteína en células humanas.
6. La velocidad de síntesis de CoQ<sub>10</sub> disminuye en ausencia de suero.
7. Durante el desarrollo embrionario de ratón, la traducción de la proteína COQ7 es inducida a los 11 días de gestación.
8. La expresión de COQ7 desciende en la etapa adulta del desarrollo de ratón.
9. El nivel de expresión de COQ7 correlaciona con los niveles de HuR y hnRNP C1/C2 en diferentes etapas del desarrollo de ratón.

### 1. Estirpes de bacterias y transformación con ADN plasmídico.

Los plásmidos y las construcciones fueron mantenidos y amplificados en la estirpe de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r<sub>k</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*). El vector pGEM-T (Promega) se utilizó para la clonación directa de productos de PCR con asas-A en los extremos.

Las transformaciones se realizaron en bacterias competentes obtenidas a través del método del CaCl<sub>2</sub>. Los cultivos a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5 se centrifugaron, se resuspendieron en 50 mM de CaCl<sub>2</sub> frío y se incubaron a 4°C durante 2 h. Tras un lavado, se resuspendió el pellet en CaCl<sub>2</sub> a 0.125 DO<sub>600nm</sub>/ml. Se usaron 50  $\mu$ l de bacterias competentes para su incubación con el ADN plasmídico durante 30 min en frío, posteriormente se sometieron a choque térmico (42°C, 2 min.) para permeabilizar la membrana y se incubaron en frío durante otros 5 min. Las bacterias se incubaron a 37°C durante 30 min. en agitación y finalmente se sembraron en medios selectivos.

Las bacterias se cultivaron en medio Luria Broth (LB), 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl. El antibiótico correspondiente se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 10 $\mu$ g/ml para seleccionar las bacterias con construcciones que contenían la resistencia al antibiótico.

En función de la cantidad requerida, los plásmidos se aislaron mediante los kit SpinClean<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep de Mbiotech para miniprep y el Plasmid Midikit de Quiagen<sup>R</sup> para midiprep. Siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante. El ADN plasmídico se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop ND-1000 de Nanodrop). Las muestras utilizadas en los análisis presentaban una ratio 260 nm/280 nm entre 1.6-1.9 para el ADN.

### 2. Muestras biológicas.

#### 2.1. Líneas celulares.

Se han usado diferentes tipos de células de mamífero. Las células HeLa se han obtenido de la American Type Culture Collection y se han cultivado en medio DMEM con un contenido en glucosa de 4.5 g/L (Gibco). El medio fue suplementado con una solución antibiótica/antimitótica (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (FBS). La condición de retirada de suero fue establecida por el cultivo de las células HeLa en ausencia de FBS.

## Materiales y Métodos

Las células MRC-5 (fibroblastos de pulmón fetal humano) fueron adquiridas en *tebu-bio* y cultivadas en DMEM de 1 g/L de glucosa, suplementado con la solución antibiótica/antimitótica (Sigma) y 10% de FBS. La condición de quiescencia se realizó mediante el cultivo celular hasta la llegada a la confluencia y la posterior retirada de suero durante 48 h. Las células control fueron cultivadas sin llegar a la confluencia y en presencia de un 10% de FBS.

### 2.2. Muestras de ratón.

Los ratones usados fueron de la especie B6 albinos B6N de Charles River France, mantenidos a una temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad de  $54 \pm 1\%$ . Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEa) de la Universidad Pablo de Olavide (UPO 2001). Como alimento se utilizó una dieta estándar de laboratorio para ratón, ref. 2014S Teklad Global 14% Protein Rodent Diet - Harlan, Italia (Composición: proteínas 14.30%, lípidos 4%, fibras 4.1%, agua 12%, vitaminas y minerales). Las condiciones de espacio fueron establecidas según el Consejo de Europa, Convención ETS 123, Anexo A, 2000 (Council of Europe 2006).

### 3. Inmunoprecipitación de complejos RNP.

La inmunoprecipitación de complejos ARN-proteína endógenos se realizó a partir de un extracto citoplásmico de células HeLa (500  $\mu\text{g}$ ). Para la lisis celular se usó un tampón que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) al que se añadió cocktail inhibidor de proteasas 1x y 100 U de RNase-out en el momento de la lisis. Una suspensión de esferas de Proteína A-Sefarosa al 50% (Sigma) que fueron precargadas con 30  $\mu\text{g}$  de anticuerpos IgG1 (BD Pharmingen) y anti-HuR (Santa Cruz Biotech.), overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  con rotación. El lisado citoplásmico y las esferas se incubaron durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$  con rotación, posteriormente se lavaron cinco veces con 1 ml de tampón NT-2 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05% Nonidet P-40). Para la extracción de los ARN de las fracciones inmunoprecipitadas, las esferas se incubaron con 100  $\mu\text{l}$  de NT-2 que contenían 20 U de DNasa I libre de RNase (30 min. a  $30^{\circ}\text{C}$ ), y se lavaron dos veces con 1 ml de tampón NT-2. Posteriormente se incubaron con 100  $\mu\text{l}$  de NT-2 al que se añadió 0.1% de SDS y 0.5 mg/ml de proteinasa K (15 min. a  $55^{\circ}\text{C}$ ), para degradar las proteínas unidas a las esferas. A partir del sobrenadante se realizó la extracción con fenol-cloroformo y el ARN fue precipitado con etanol y acetato amónico (3M, pH 5.2).

### 4. Extracción de ARN y síntesis de cDNA.

Para la purificación de ARN total se utilizaron cultivos celulares en placas de 35 mm. La extracción se realizó mediante el reactivo comercial easy-BLUE Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente las muestras fueron tratadas con DNAasa I Amplification Grade (Sigma) para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico.

El ARN se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific™). Las muestras utilizadas en los análisis presentaban una ratio  $A_{260}:A_{230}$  mayor a 1.7 y una ratio  $A_{260}:A_{280}$  entre 1.8 y 2. La calidad del ARN se analizó mediante electroforesis en genes de agarosa-TBE al 1%.

El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de ARN por transcripción reversa, a través del kit iScript cDNA Sintesis Kit (Bio-Rad) y según las instrucciones del fabricante. El protocolo utilizado fue el siguiente: 5 min a 25°C, 45 min a 42°C, 5 min a 85°C y 5 min a 4°C; y la reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad).

### 5. PCR en tiempo real.

La expresión génica se analizó por PCR en tiempo real, utilizando SensiMix SYBR & Fluorescence Kit (Quantace), según las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 2 µl de ADNc, en un lector de fluorescencia MyiQ™ Single Color, Real Time PCR Detection System (Bio-Rad), acoplado a un termociclador convencional iCycler (Bio-Rad). El protocolo utilizado se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 1**

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	1	1	95	10:00
2	35	1	95	00:15
		2	Según Tm del primer	00:30
		3	72	00:30
3 (curva de melting)	>80	1	95	01:00
		2	55	01:00
		3	55 (0.5°C/ciclo)	00:10

Los primers utilizados se muestran en la tabla 2 y se diseñaron con el software Beacon Designer<sup>TM7</sup> (Premier Biosoft International), en base a las secuencias de la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Todos los resultados se normalizaron a los niveles del ARNr 18S.

**Tabla 2**

Gen	Sentido	Antisentido
<i>COQ7</i>	5' GGACGCTGATGGAGGAGGAC 3'	5' AGGACGGCATAGGCTGGAC 3'
<i>HuR</i>	5' TCGTCAACTACCTCCCTCAGAAC 3'	5' GCTGTGTCCTGCTACTTTATCCC 3'
<i>GAPDH</i>	5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'
<i>18S</i>	5' CCGAGCCGCCTGGATACC 3'	5' GGAATAACGCCGCCGCATC 3'

### 6. Amplificación de hCOQ7 por PCR recombinante.

En reacciones de PCR para la amplificación y secuenciación, los cebadores usados fueron diseñados a través del programa informático Primer Premier 5.0 (Biosoft). Como molde para las reacciones de amplificación se usó ADNc sintetizado por RT-PCR, a partir de ARN de células HeLa. Los fragmentos de PCR se sometieron a electroforesis de ADN en geles de agarosa (1%)-TBE con bromuro de etidio. Tras su purificación mediante el kit SpinClean<sup>TM</sup> Extraction Kit de Mbiotech, los productos se clonaron en el vector comercial pGEM-T Easy Vector (Promega) para su almacenamiento y secuenciación.

La estrategia de PCR recombinante se utilizó para la obtención del transcrito completo de hCOQ7 debido a la imposibilidad de amplificación mediante varias enzimas de uso rutinario en nuestro laboratorio, entre ellas Pfu polimerase (MBL-Pfu polimerase), Taq polimerase (MBL-TAQ polimerase), Velocity DNA Polymerase (Bioline), ACCUZYME<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Bioline), Expand High Fidelity PCR System (Roche).

La primera etapa consistió en la amplificación de los distintos fragmentos del transcrito de hCOQ7 por *Touch Down* PCR (tabla 3) usando la enzima Pfu polimerasa (MBL-Pfu polimerasa).

**Tabla 3**

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	1	Desnaturalización	95	5
2	24	Desnaturalización	95	1
		Alineamiento	55 ó 50 ( $\Delta$ -0.5°C/min.)	1
		Extensión	72	2
3	10	Desnaturalización	95	1
		Alineamiento	45	1
		Extensión	72	2
4	1	Extensión	70	10

Los diferentes fragmentos amplificados y los cebadores utilizados se resumen en la tabla 4 y se diseñaron de forma que todas las regiones contenían secuencias solapantes entre ellas. El cebador sentido para el fragmento 5'UTR-RC incluía la secuencia promotora de la ARN polimerasa en el extremo 5'.

**Tabla 4**

Fragmento de hCOQ7	Tamaño (pb)	Primer Sentido	Primer Antisentido
5'UTR-RC	802	5'-(T <sub>7</sub> )GTCCGAGCCAAGGGCACTA-3'	5'-AACGATAACTGTACACCTGTTTCTC-3'
3'UTR A	811	5'-GCTTGAGCACCATGACATAGG-3'	5'-TAGGAGAAAATGGGCCTGG-3'
3'UTR B- 3'UTR C	1415	5'-GCTTGAGCACCATGACATAGG-3'	5'-CCTTAAGAAAACCTTGTTGTGC-3'

Una vez obtenidos, los fragmentos fueron fusionados y amplificados mediante reacciones que permitían la hibridación de las secuencias solapantes y su posterior amplificación. Estas reacciones se indican en la tabla 5. Como molde se usaron entre 200 y 300 ng de fragmentos a fusionar, cuyo tamaño era similar. En primer lugar se fusionó 5'UTR-RC con 3'UTR A, y posteriormente, 5'UTR-RC-3'UTR se unió al fragmento 3'UTR B-C. La temperatura de fusión estándar utilizada en reacciones de PCR recombinantes es de 37°C, en el caso de fragmentos de COQ7 la fusión se alcanzó aumentando la temperatura a 50°C-



## Materiales y Métodos

53°C. Finalmente se obtuvo el transcrito completo de *COQ7*, incluidas las regiones UTRs y la secuencia del promotor de la ARN T7 polimerasa en el extremo 5' para experimentos de transcripción *in vitro*.

**Tabla 5**

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	1	Desnaturalización	95	5
2	30	Desnaturalización	95	1
		Alineamiento de fragmentos de PCR	>50	3
		Extensión	72	2
Adición de los cebadores				
3	1	Desnaturalización	95	5
4	35	Desnaturalización	95	1
		Alineamiento	50	1
		Extensión	72	2
5	1	Extensión	72	30

### 7. Transcripción *in vitro*.

Una fracción de ARN total extraído de células HeLa se usó como molde para la síntesis del ADNc y amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes del transcrito de *COQ7*. El *COQ7* completo, se obtuvo a partir de la construcción pGEMT-*COQ7* obtenido por PCR recombinante. Los cebadores utilizados contenían en el extremo 5' la secuencia del promotor de la T<sub>7</sub> ARN polimerasa (CCAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGA).

Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa (Sigma) y para su purificación se usó el SpinClean™ Extraction Kit de Mbiotech. Las sondas de ARN se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* a través del kit MAXIscript T7 (Ambion), según las indicaciones del fabricante y añadiendo los nucleótidos modificados según se requiera para el ensayo.

### 8. Ensayo de unión ARNm-proteínas celulares.

Los cebadores y los correspondientes productos de PCR amplificados, indicados en la tabla 6, se usaron como molde para la síntesis de las sondas de ARN. En las reacciones de transcripción *in vitro*, realizadas mediante el kit MAXIscript T7 (Ambion), según las

## Materiales y Métodos

instrucciones del fabricante, se incluyeron 20  $\mu\text{Ci}$  del nucleótido  $\alpha\text{-(P}^{32}\text{)}\text{-UTP}$  (GE Healthcare), para el marcaje radiactivo de las ribosondas. El ARN se purificó por fenilización y precipitación con LiCl.

**Tabla 6**

Producto (pb)	Sentido	Antisentido
hCOQ7 (2591)	5'-(T <sub>7</sub> )GTCCGAGCCAAGGGCACTA-3'	5'-CCTTAAGAAAACCTTGTTGTGC-3'
5'UTR (514)	5'-(T <sub>7</sub> )GTCCGAGCCAAGGGCACTA-3'	5'-TGCTCCATATTCGCCTGCA3'-
RC (771)	5'-(T <sub>7</sub> )ACGAAGTGGTTGCTTTTTTTAG-3'	5'-AACGATAACTGTACACCTGTTTCTC-3'
3'UTR A (811)	5'-(T <sub>7</sub> )GCTTGAGCACCATGACATAGG-3'	5'-TAGGAGAAAATGGGCCTGG-3'
3'UTR B (738)	5'-(T <sub>7</sub> )GGCTCAGTGATCCTCCCG-3'	5'-TTGGGGGATTTTTTTGGG-3'
3'UTR C (759)	5'-(T <sub>7</sub> )AGTTGTGGATTATTTGTGAAATTG-3'	5'-CCTTAAGAAAACCTTGTTGTGC-3'
3'UTR GAPDH (511)	5'-(T <sub>7</sub> )CCTCAACGACCACTTTGTCA-3'	5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTTATT-3'

Posteriormente se llevó a cabo un experimento de UV-Crosslinking usando 35  $\mu\text{g}$  de proteínas, obtenidas a partir de un extracto total de proteína de células HeLa, que se incubaron durante 10 min a 30°C, con  $1 \times 10^5$  c.p.ms de sondas radiomarcadas, en presencia del tampón RLN (NaPHO<sub>4</sub>- Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 1mM) y ARNt. Posteriormente se añadió 20 U de RNase T1 (Boehringer Mannheim), con el fin de degradar el ARN libre (30 min. a 37°C). La reacción se expuso a 254nm de luz UV (Stratalinker 1800; Stratagene) durante 6 min. en hielo.

Para los ensayos de competición, se añadió a la reacción un exceso molar de 100 veces de ARN sin marcar 10 min. antes de la adición de la sonda marcada. Los complejos ARN-proteínas se resolvieron a través de una electroforesis SDS-PAGE (10% ó 12%). Finalmente los geles se secaron y las proteínas se detectaron por autorradiografía.

### 9. Ensayo de eficiencia traduccional.

Los cebadores y los productos de PCR usados como molde para la síntesis de las sondas de ARN, mediante transcripción *in vitro* (kit MAXIscript T7 de Ambion), se indican en la siguiente tabla. Las ribosondas fueron purificadas por fenolización y precipitadas con LiCl.

**Tabla 7**

Producto	Sentido	Antisentido
COQ7	5'-(T <sub>7</sub> )GTCCGAGCCAAGGGCACTA-3'	5'-CCTTAAGAAAACCTTGTGTGC-3'
Δ 3'UTR	5'-(T <sub>7</sub> )GTCCGAGCCAAGGGCACTA-3'	5'-AACGATAACTGTACACCTGTTTCTC-3'
Δ BC	5'-(T <sub>7</sub> )GTCCGAGCCAAGGGCACTA-3'	5'-TAGGAGAAAATGGGCCTGG-3'

Las reacciones de traducción *in vitro* se realizaron a partir de 100 ng de cada ribosonda, mediante el kit nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se incluyó 40 µCi de L-(<sup>35</sup>S)metionina y 40U de RNasin. Tras 1 h de reacción las muestras se resolvieron en una electroforesis SDS-PAGE (10-12%).

### 10. Síntesis *in vitro* de transcritos marcados con biotina y análisis de RNP unidos a ARN.

La síntesis de los transcritos biotinilados se realizó mediante el kit MAXIscript T7 (Ambion). En las reacciones de transcripción *in vitro* se incluyó el nucleótido modificado biotin-CPT (Enzo Life Sciences AG), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transcritos fueron purificados a través de las columnas NucAway Spin Columns (Ambion). Los cebadores y productos de PCR usados como molde, se muestran en la tabla 6, excepto COQ7 completo.

El ensayo de biotin pulldown se realizó usando esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina, Dynabeads M-280 Streptavidin (DYNAL Biotech Inc. NY), que fueron prelavadas dos veces con 200 µl de solución A (0.1 mM NaOH, 0.05 M NaCl), una vez con 200 µl de una solución B (0.1 M NaCl) y finalmente se les añadió 10 µl de tampón TENT 1X (TENT 2X: 20 mM Tris-HCl pH8, 2 mM EDTA pH8, 500 mM NaCl, 1% v/v Tritón X-100). Para la formación de los complejos ARN-proteína se incubó un extracto total de células HeLa (40 µg) con cada uno de los transcritos biotinilados (1 µg), durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se aislaron los complejos mediante su incubación con las esferas magnéticas (2 h a temperatura ambiente). La fracción inmunoprecipitada con estreptavidina se incubó a

## Materiales y Métodos

95°C durante 5 min y las proteínas unidas a cada sonda biotinilada se analizaron por western blotting usando anticuerpos que reconocían a las once RBPs siguientes: HuR hnRNP C1/C2, Nucleolina (C23), TIAR (C18), FMR, TIA 1, TTP (N18) de Santa Cruz, Biotech., NF-90 (DRB76) de BD Biosciences, AUF1 de Millipore, PTBP1 y hnRNP K de Abcam.

### 11. Análisis de la estabilidad del ARNm.

Fibroblastos MRC5 sembrados en placas de 60 mm, se incubaron con Actonimicina D a 2µg/ml (Invitrogen), para inhibir la transcripción de novo. Las células fueron recogidas en los tiempos indicados para la extracción de ARN. La vida media de los transcritos se obtuvo analizando los niveles de ARNm por PCR en tiempo real de *COQ7* y *GAPDH*, normalizados con 18S.

### 12. Extracción de proteínas celulares.

#### 12.1. Extracción total.

Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en RIPA Buffer (Pierce). Tras la lisis, que se realizó según las condiciones del fabricante, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min. a 4°C

#### 12.2. Extracción citoplásmica y nuclear.

Para la preparación de los extractos se utilizó una adaptación del protocolo descrito por Schreiber y colaboradores (Schreiber, Matthias, Müller, & Schaffner, 1989). Las células se recogieron y se resuspendieron en un tampón hipoosmótico (10mM Hepes, 10mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM de EDTA, 0.6% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1x cócktel inhibidor de proteasa (Sigma), 1x cócktel inhibidor de fosfatasa (Sigma)). El lisado celular se incubó en hielo durante 5 min. en hielo, posteriormente se sometió a vortex 10 seg. y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante fue recogido como extracto citoplásmico y se guardó a -80°C.

El pellet fue resuspendido en un tampón hiperosmótico (20 mM Hepes, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1x cócktel inhibidor de proteasa (Sigma), 1x cócktel inhibidor de fosfatasa (Sigma) y se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente el lisado se sometió a centrifugación (16.000 x g, 30 min. a 4°C) y el sobrenadante se recogió como extracto de proteínas nucleares que se guardó a -80°C.

### **12.3. Homogenado de muestras de ratón.**

Inmediatamente después del sacrificio se diseccionaron los órganos y los embriones de los animales y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Los embriones fueron limpiados antes de la congelación y se partió de una mezcla de 3 embriones que se homogeneizaron en buffer de lisis 1:9 p/v (2 mM Tris-HCl, 20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 70 mM Sacarosa y 220 mM Manitol) suplementado con 1 mM PMSF y coctel inhibidor de proteasa 1:50 v/v (Sigma). Se usó un homogenizador Micra-D1 (ART-Labortechnik) y seguidamente se centrifugaron las muestras a 700 x *g*, durante 10 min, para eliminar los núcleos y los desechos. A partir de un pool de hígado y corazón procedente de tres individuos diferentes se procedió a su homogenización de la misma forma en embriones.

### **13. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.**

Las proteínas de los diferentes extractos y homogenados fueron cuantificadas por el método Bradford (Brandfor 1976). Para ello se utilizó el reactivo BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad) y NaOH 1M y tras una incubación de 5 min. a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la muestra a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Espectrofotómetro ThermoSpectronic UNICAMUV 500e). Los resultados se compararon con una curva patrón de concentraciones conocidas (0-12 µg/µl) de inmunoglobulina G, para calcular la concentración relativa.

### **14. Análisis y detección de proteínas por Western Blotting.**

Cantidades determinadas de proteínas (20-80µg) fueron resuspendidas en tampón Laemmli (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturalizante en SDS (SDS-PAGE) y geles de Acrilamida al 10-12.5% (Bio-Rad), utilizando un sistema Mini Protean III (Bio-Rad). Una vez resueltas, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Ge Healthcare), con sistema semi-seco (Trans-Blot® SD; Bio-Rad). Como control de carga se usó la tinción de las proteínas con el reactivo Ponceau S (Sigma). Seguidamente las membranas fueron bloqueadas, durante 1 h a temperatura ambiente en el tampón TTBS (Tris 20 mM pH 7.4 NaCl 150 mM y 0.1 % de Tween 20 (BioRad)) con 5% p/v de Blotting Grade Blocker not-fat dry milk BioRad), para posteriormente incubarlas durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo

## Materiales y Métodos

primario. La incubación de las membranas con el anticuerpo secundario específico (conjugados con HRP) se realizó durante 2 h, a temperatura ambiente.

Anticuerpo 1º	Peso Molecular	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
Policlonal anti-COQ7 (Santa Cruz Biotechnology)	24 kDa	1:1000	Anti-goat IgG, H&L chain specific <b>(Calbiochen)</b>	1:10.000
Monoclonal anti-HuR (Santa Cruz Biotechnology)	36 kDa	1:1000	Anti-mouse Light chain specific <b>(Jackson Immuno Research)</b>	1:5.000
Monoclonal anti-hnRNP C1/C2 (Santa Cruz Biotechnology)	40 kDa	1:1000	Anti-Rabbit IgG, H&L chain specific <b>(Calbiochen)</b>	1:5.000
Policlonal anti-AUF1 (Millipore)	37, 40, 42, 45 kDa	1:1000	Anti-Rabbit IgG, H&L chain specific (Calbiochen)	1:5.000
Actina (Sigma)	42 kDa	1:1000	Anti-mouse Light chain specific (Jackson Immuno Research)	1:5.000

Para el revelado se utilizó el reactivo Immun-Star Chemiluminescent kit (Bio-Rad), Liminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore) y se hizo en un revelador automático (Amersham-Pharmacia), y en algunos casos se usó el sistema Molecular Imager<sup>R</sup> ChemiDoc™ XRS (Biorad)

### 15. Silenciamiento génico mediante transfección de oligos siRNA.

Para silenciar HuR en células HeLa y MRC5, se usó una mezcla de 3 siRNA complementarios a diferentes regiones de HuR, siHuR1 (5'-AATCTTAAGTTTCGTAAGTTA-3'), siHuR2 (5'-TTCCTTTAAGATATATATAA-3') dirigidos hacia la 3'UTR y siHuR3 (5'-AAACCAACAAGTCCCACAAAT-3') dirigido hacia la región codificante. Un siRNA control (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3') fue utilizado como control negativo. La concentración final de cada siRNA fue de 10 nM por placa.

Las células se sembraban en una placa de 60 mm, al 50% de confluencia en medio DMEM al 5% de FBS sin antibiótico. Al día siguiente se realizó la mezcla de transfección en medio Opti-MEM® Reduced Serum (Gibco), donde se incluyó el agente de transfección Oligofectamine™ (Invitrogen) y el siRNA para la correspondiente formación de complejos.

## Materiales y Métodos

Tras 30 min. de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se añadió al cultivo celular durante 6h a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron en PBS y se cultivaron en DMEM al 5% de FBS sin antibiótico durante 48 h a 37°C. Finalmente las células fueron recogidas para el correspondiente análisis.

### 16. Transfección de líneas celulares con ADN plasmídico.

Las células se sembraban en una placa de 60 mm, al 80% de confluencia en medio DMEM al 5% de FBS sin antibiótico. Al día siguiente se realizó la mezcla de transfección compuesta por el medio Opti-MEM® (Gibco), el agente de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y 2µg de ADN por placa y tras 30 min. de incubación a temperatura ambiente se añadió al cultivo celular durante 6h a 37°C. Posteriormente las células se lavaron en PBS y se cultivaron en DMEM al 5% de FBS sin antibiótico durante 48 h a 37°C. Finalmente las células fueron recogidas para el correspondiente análisis.

### 17. Extracción de lípidos y medida de los niveles de CoQ<sub>10</sub>.

Para la extracción lipídica, a partir de muestras celulares, se usó el método descrito previamente por Carlos-Ocaña et al., 2002. Se partió de 1 mg de proteínas totales y se usó CoQ<sub>6</sub> como estándar interno, para calcular la eficiencia de la extracción. Las células se lisaron con 500 µl de SDS al 1% mediante vórtex durante 1 min y se mezcló con 2 ml de una solución de etanol:isopropanol 95:5 por vórtex durante 1 min. Para extraer el CoQ<sub>10</sub> se añadió 5 ml de hexano a las muestras que fueron mezcladas por vórtex, 1 min. Tras una centrifugación a 1000xg durante 5 min. a 4°C, la fase superior orgánica se recogió y la extracción con hexano se repitió 3 veces. La fracción recogida fue secada en un rotavapor y el residuo seco se resuspendió en 300 µl de etanol HPLC-Grade, la recuperación en etanol se repitió 3 veces. Finalmente la muestra se volvió secar en un Speed-Vac durante 2-3 horas a 45°C.

### 18. Cuantificación de los niveles de CoQ<sub>10</sub>.

Se realizó mediante separación de de lípidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó una columna de fase reversa Kromasil C-18 termoestabilizada a 40°C con un horno de columna. La muestra se reconstituyó en un volumen de 60-100 µl de Etanol HPLC-Grade justo antes de la inyección. Detrás del inyector automático se colocó la célula guarda a +500 mV, para la oxidación de la fase móvil y de la muestra. La célula analítica se ajustó a E1= -500 mV y E2= +500 mV. La fase móvil utilizada

## Materiales y Métodos

fue metanol/n-propanol 65:35 con perclorato de litio 1,38 mM, a un flujo constante de 1 ml/min. Se utilizó un estándar externo compuesto por CoQ<sub>6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, para conocer el tiempo de retención de cada lípido. El sistema estaba acoplado a un detector ultravioleta en serie Diode Array 166 (Beckman Coulter) y a un detector electroquímico (ESA Coulochem III). El cromatograma resultante se analizó a través del software 32 Karat 5.0 (Beckman Coulter).

### 19. Determinación de la tasa de biosíntesis de CoQ<sub>10</sub>.

La tasa de síntesis de CoQ<sub>10</sub> en células humanas se analizó mediante la incorporación del precursor del anillo aromático del CoQ<sub>10</sub> radiomarcado, p-hidroxibenzoato ((<sup>14</sup>C)-pHB), en presencia de un exceso de 100 veces del mismo precursor no marcado. La extracción y el análisis de los niveles de CoQ<sub>10</sub> radiomarcado se realizó como se indicó anteriormente, y la detección se llevó a cabo mediante un detector de radiactividad (Radioflow Detectro LB 509, Berthod Technologies).



## Bibliografía

- Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2010). Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 1(2), 214–229.
- Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Kim, H. H., & Gorospe, M. (2008). Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biological Chemistry*, 389(3), 243.
- Abdelmohsen, K., Pullmann, J., Lal, A., Kim, H. H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J. D., et al. (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression. *Molecular Cell*, 25(4), 543–557.
- Aberg, F., Zhang, Y., Teclebrhan, H., Appelkvist, E. L., & Dallner, G. (1996). Increases in tissue levels of ubiquinone in association with peroxisome proliferation. *Chemicobiological interactions*, 99(1-3), 205–218.
- Aithal HN, Joshi VC, R. T. (1968). Effect of cold exposure on the metabolism of ubiquinone in the rat., 162(1), 66–72.
- Al-Khalaf, H. H., Colak, D., Al-Saif, M., Al-Bakheet, A., Hendrayani, S.-F., Al-Yousef, N., Kaya, N., et al. (2011). p16INK4A Positively Regulates Cyclin D1 and E2F1 through Negative Control of AUF1. (V. Cheriya, Ed.) *PLoS ONE*, 6(7), 13.
- Artuch, R., Salviati, L., Jackson, S., Hirano, M., & Navas, P. (2009). Coenzyme Q<sub>10</sub> Deficiencies in Neuromuscular Diseases Inherited Neuromuscular Diseases. In C. Espinosa, V. Felipo, & F. Palau (Eds.), (Vol. 652, pp. 117–128). Springer Netherlands.
- Asencio, C., Navas, P., Cabello, J., Schnabel, R., Cypser, J. R., Johnson, T. E., & Rodríguez-Aguilera, J. C. (2009). Coenzyme Q supports distinct developmental processes in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 130(3), 145–153.
- Ashby, M. N., & Edwards, P. A. (1990). Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(22), 13157–13164.
- Atasoy, U., Watson, J., Patel, D., & Keene, J. D. (1998). ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation. *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 2(Pt 21), 3145–3156.
- Barker, A., Epis, M. R., Porter, C. J., Hopkins, B. R., Wilce, M. C. J., Wilce, J. A., Giles, K. M., et al. (2012). Sequence requirements for RNA binding by HuR and AUF1. *Journal of Biochemistry*, 151(4), 423–37.
- Barkovich, R. J., Shtanko, A., Shepherd, J. A., Lee, P. T., Myles, D. C., Tzagoloff, A., & Clarke, C. F. (1997). Characterization of the COQ5 Gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 272(14), 9182–9188.

## Bibliografía

- Barreau, C., Paillard, L., & Osborne, H. B. (2006). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Research*, 33(22), 7138–7150.
- Barros, M. H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Clarke, C. F., & Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *The Journal of biological chemistry*, 280(52), 42627–35.
- Bentinger, M., Tekle, M., Brismar, K., Chojnacki, T., Swiezewska, E., & Dallner, G. (2008). Stimulation of coenzyme Q synthesis. *Biofactors Oxford England*, 32(1-4), 99–111. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096105>
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010a). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), 74–9.
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010b). Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 74–79.
- Bentinger, M., Turunen, M., Zhang, X. X., Yvonne Wan, Y. J., & Dallner, G. (2003). Involvement of Retinoid X Receptor [alpha] in Coenzyme Q Metabolism. *Journal of Molecular Biology*, 326(3), 795–803.
- Bentley, P., Calder, I., Elcombe, C., Grasso, P., Stringer, D., & Wiegand, H. J. (1993). Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 31(11), 857–907.
- Berger, A., Stierkorb, E., & Nickenig, G. (2005). The role of the AUUUUA hexamer for the posttranscriptional regulation of the AT1 receptor mRNA stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), 805–812.
- Bhagavan, H. N., & Chopra, R. K. (2006). Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Research*, 40(5), 445–453.
- Biochem, J., Nakamura, M., Hayashi, T., Science, E., & Health, P. (1994). One and Two-Electron Subcellular Fractions of Quinones by Rat Liver. *Public Health*, 1147, 1141–1147.
- Blaxall, B. C., Pende, A., Wu, S. C., & Port, J. D. (2002). Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (huRNP D) and HuR for A+U-rich mRNAs. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 232(1), 1–11.
- Branicky, R., Bénard, C., & Hekimi, S. (2000). clk-1, mitochondria, and physiological rates. *BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology*, 22(1), 48–56.
- Brea-Calvo, G., Siendones, E., Sánchez-Alcázar, J. a, De Cabo, R., & Navas, P. (2009). Cell survival from chemotherapy depends on NF-kappaB transcriptional up-regulation of coenzyme Q biosynthesis. *PloS one*, 4(4), e5301.

## Bibliografía

- Brea-Calvo, G., Siendones, E., Sánchez-Alcázar, J. A., De Cabo, R., & Navas, P. (2009). Cell Survival from Chemotherapy Depends on NF- $\kappa$ B Transcriptional Up-Regulation of Coenzyme Q Biosynthesis. (J. A. L. Calbet, Ed.) *PLoS ONE*, 4(4), 9.
- Brennan, C. M., & Steitz, J. A. (2000, September 18). HuR and mRNA stability.
- Casarin, A., Jimenez-Ortega, J. C., Trevisson, E., Pertegato, V., Doimo, M., Ferrero-Gomez, M. L., Abbadi, S., et al. (2008). Functional characterization of human COQ4, a gene required for Coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 35–39.
- Castello A, Horos R, Strein C, Fischer B, Eichelbaum K, Steinmetz LM, Krijgsveld J, H. M. (2013). System-wide identification of RNA-binding proteins by interactome capture. *Nature Protocols*, 8(3), 491–500.
- Cazzola, M., & Skoda, R. C. (2000). Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood*, 95(11), 3280–3288.
- Chang, N., Yi, J., Guo, G., Liu, X., Shang, Y., Tong, T., Cui, Q., et al. (2010). HuR Uses AUF1 as a Cofactor To Promote p16INK4 mRNA Decay. *Molecular and Cellular Biology*, 30(15), 3875–3886.
- Chen, C. Y., & Shyu, A. Bin. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465–470.
- Chen, C. Y., Xu, N., & Shyu, A. Bin. (2002). Highly Selective Actions of HuR in Antagonizing AU-Rich Element-Mediated mRNA Destabilization. *Molecular and Cellular Biology*, 22(20), 7268–7278.
- Chen, H., Hewison, M., & Adams, J. S. (2006). Functional characterization of heterogeneous nuclear ribonuclear protein C1/C2 in vitamin D resistance: a novel response element-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39114–39120.
- Cooper, T. A., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2009). RNA and disease. *Cell*, 136(4), 777–793.
- Correll, C. C., Ng, L., & Edwards, P. A. (1994). Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17390–17393.
- Crane, F. L., & Navas, P. (1997). The diversity of coenzyme Q function. *Molecular Aspects of Medicine*, 18 Suppl(Suppl), S1–S6.
- Crane FL, Hatefi Y, Lester RL, W. C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochemica et Biophysica acta*, 25(1), 220–1.
- Czaplinski, K., & Singer, R. H. (2006). Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(12), 687–693.

## Bibliografía

- Dallner, G., & Sindelar, P. J. (2000). Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 285–294.
- David, P. S., Tanveer, R., & Port, J. D. (2007). FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1. *Rna New York Ny*, 13(9), 1453–1468.
- Devun, F., Walter, L., Belliere, J., Cottet-Rousselle, C., Leverve, X., & Fontaine, E. (2010). Ubiquinone Analogs: A Mitochondrial Permeability Transition Pore-Dependent Pathway to Selective Cell Death. (A. Lewin, Ed.) *PLoS ONE*, 5(7), 8.
- Doller, A., Pfeilschifter, J., & Eberhardt, W. (2008). Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cellular Signalling*, 20(12), 2165–2173.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piñol-Roma, S., & Burd, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual Review of Biochemistry*, 62(0066-4154 LA - eng PT - Journal Article PT - Review PT - Review, Academic RN - 0 (Heterogeneous-Nuclear Ribonucleoproteins) RN - 0 (RNA, Heterogeneous Nuclear) RN - 0 (RNA, Messenger) RN - 0 (Ribonucleoproteins) SB - IM), 289–321.
- Dreyfuss, Gideon, Kim, V. N., & Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 195–205.
- Duncan, A. J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I. P., López, L. C., Hirano, M., et al. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *The American Journal of Human Genetics*, 84(5), 558–566.
- Echtay, K. S., Winkler, E., & Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, 408(6812), 609–613.
- Elmberger PG, Kalén A, Lund E, Reihner E, Eriksson M, Berglund L, Angelin B, D. G. (1991). Effects of pravastatin and cholestyramine on products of the mevalonate pathway in familial hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, 32(6), 935–40.
- Ernster, L., & Forsmark-Andrée, P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *The Clinical investigator*, 71(8 Suppl), S60–S65.
- Ewbank, J. J., Barnes, T. M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H., & Hekimi, S. (1997). Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science*, 275(5302), 980–983.
- Fan, X. C., & Steitz, J. A. (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15293–15298.
- Felkai, S., Ewbank, J. J., Lemieux, J., Labbé, J. C., Brown, G. G., & Hekimi, S. (1999). CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 18(7), 1783–1792.

## Bibliografía

- Festenstein, G. N., Heaton, F. W., Lowe, J. S., Morton, R. A. (1955). A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids. *Biochemical Journal*, 59, 558–66.
- Fontaine, E., & Bernardi, P. (1999). Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(4), 335–45.
- Galbán, S., Kuwano, Y., Pullmann, R., Martindale, J. L., Kim, H. H., Lal, A., Abdelmohsen, K., et al. (2008). RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 93–107.
- Galpern, W. R., & Cudkowicz, M. E. (2007). Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion*, 7(Supplement 1), S146–S153.
- Gemin A, Sweet S, Preston TJ, S. G. (2005). Regulation of the cell cycle in response to inhibition of mitochondrial generated energy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(4), 1122–32.
- Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., & Schneiderat, P. (2007). The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring. *Brain*.
- Genova, M. L., & Lenaz, G. (2011). New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors Oxford England*, 37(5), 330–354.
- Gin, P., & Clarke, C. F. (2005). Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), 2676–81.
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*, 582(14), 1977–1986.
- Gomez F, Saiki R, Chin R, Srinivasan C, C. C. (2012). Restoring de novo coenzyme Q biosynthesis in *Caenorhabditis elegans* coq-3 mutants yields profound rescue compared to exogenous coenzyme Q supplementation. *Gene*, 506(1), 106–16.
- Gorospe, M., & Baglioni, C. (1994). Degradation of unstable interleukin-1 alpha mRNA in a rabbit reticulocyte cell-free system. Localization of an instability determinant to a cluster of AUUUA motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 11845–11851.
- Gouble, A., & Morello, D. (2000). Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development. *Oncogene*, 19(47), 5377–5384.
- Gratacós, F. M., & Brewer, G. (2010). The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 1(3), 457–473. doi:10.1002/wrna.26
- Gustav, D., Kerstin, B., Tadeusz, C., & Ewa, S. (2003). Regulation of coenzyme Q biosynthesis and breakdown. *BioFactors*, 18(1), 11–22.

## Bibliografia

- Halestrap, A. P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), 821–831.
- Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., Xie, L. X., et al. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 2013–2024.
- Horvath, R., Czermin, B., Gulati, S., Demuth, S., Houge, G., Pyle, A., Dineiger, C., et al. (2011). Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in CABP1/ADCK3. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(2), 1–5.
- Hsieh, E. J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U. C., Saiki, R., Marbois, B. N., & Clarke, C. F. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Archives of biochemistry and biophysics*, 463(1), 19–26.
- Hsu, a Y., Poon, W. W., Shepherd, J. a, Myles, D. C., & Clarke, C. F. (1996). Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the Escherichia coli UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry*, 35(30), 9797–806.
- Hsu, A. Y., Do, T. Q., Lee, P. T., & Clarke, C. F. (2000). Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1484(2-3), 287–297.
- Huang, M., Rech, J. E., Northington, S. J., Flicker, P. F., Mayeda, A., Krainer, A. R., & LeSturgeon, W. M. (1994). The C-protein tetramer binds 230 to 240 nucleotides of pre-mRNA and nucleates the assembly of 40S heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Molecular and Cellular Biology*, 14(1), 518–533.
- Hunt MC, Yang YZ, Eggertsen G, Carneheim CM, Gåfvels M, Einarsson C, A. S. (2000). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) regulates bile acid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28947–53.
- Hursting, S. D., Lavigne, J. A., Berrigan, D., Perkins, S. N., & Barrett, J. C. (2003). Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annual Review of Medicine*, 54(1), 131–152.
- Ibrahim, W. H., Bhagavan, H. N., Chopra, R. K., & Chow, C. K. (2000). Dietary coenzyme Q10 and vitamin E alter the status of these compounds in rat tissues and mitochondria. *The Journal of nutrition*, 130(9), 2343–8.
- Ishimaru, D., Ramalingam, S., Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Dellis, S., Tholanikunnel, B. G., Fernandes, D. J., et al. (2009). Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Molecular cancer research MCR*, 7(8), 1354–1366.
- Issemann, I., & Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), 645–650.



## Bibliografía

- Izquierdo, J M, & Cuezva, J. M. (1997a). Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5255–5268.
- Izquierdo, J M, & Cuezva, J. M. (1997b). Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5255–5268.
- Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, C. J. (1995). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *Journal of Biological Chemistry*, 270(17), 10342–50.
- Izquierdo, José M. (2006). Control of the ATP synthase beta subunit expression by RNA-binding proteins TIA-1, TIAR, and HuR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), 703–711.
- Izquierdo, José M. (2010). Heterogeneous ribonucleoprotein C displays a repressor activity mediated by T-cell intracellular antigen-1-related/like protein to modulate Fas exon 6 splicing through a mechanism involving Hu antigen R. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8001–8014.
- James, A. M., Cocheme, H. M., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2005). Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species: implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21295–21312.
- Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Antos-Krzeminska, N., & Sluse, F. E. (2009). Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7), 792–799.
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Hsieh, E. J., Wu, M., Barros, M. H., Clarke, C. F., et al. (2005). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 280(36), 31397–404.
- Jonassen, T, & Clarke, C. F. (2000). Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 275(17), 12381–7.
- Jonassen, Tanya, Larsen, P. L., & Clarke, C. F. (2001). A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 421–426.
- Kamma, H., Portman, D. S., & Dreyfuss, G. (1995). Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Experimental Cell Research*, 221(1), 187–196.
- Kamzalov, S., & Sohal, R. S. (2004). Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and alpha-tocopherol levels in the rat. *Experimental Gerontology*, 39(8), 1199–1205.

## Bibliografía

- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K., & Gorospe, M. (2006). Translational Control of Cytochrome c by RNA-Binding Proteins TIA-1 and HuR. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), 3295–3307.
- Keene, J. D. (1999). Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 5–7. Retrieved from <http://www.pnas.org>
- Kim, H. S., Wilce, M. C. J., Yoga, Y. M. K., Pendini, N. R., Gunzburg, M. J., Cowieson, N. P., Wilson, G. M., et al. (n.d.). Different modes of interaction by TIAR and HuR with target RNA and DNA. *Nucleic Acids Research*.
- Klingenberg, M., Winkler, E., & Echtaý, K. (2001). Uncoupling protein, H<sup>+</sup> transport and regulation. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 6), 806–811.
- Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., et al. (2008). ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q10 Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 82(3), 661–672.
- Lal, A., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Kawai, T., Galban, S., Yang, X., Brewer, G., et al. (2006). Posttranscriptional Derepression of GADD45[α] by Genotoxic Stress. *Molecular Cell*, 22(1), 117–128.
- Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., & Gorospe, M. (2005). Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin [α]. *EMBO J*, 24(10), 1852–1862.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal*, 23, 3092–3102.
- Lapointe J, Wang Y, Bigras E, H. S. (2012). The submitochondrial distribution of ubiquinone affects respiration in long-lived Mcl1<sup>+/−</sup> mice. *The Journal of Cell Biology*, 199(2), 215–24.
- Lapointe, J. ., & Hekimi, S. (2008). Early Mitochondrial Dysfunction in Long-lived Mcl1<sup>+/−</sup> Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 26217–26227.
- Lapointe, J., & Hekimi, S. (2008). Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mcl1<sup>+/−</sup> mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 26217–26227.
- Larsen, P. L., & Clarke, C. F. (2002). Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science*, 295(5552), 120–123.
- Le Ber, I., Dubourg, O., Benoist, J.-F., Jardel, C., Mochel, F., Koenig, M., Brice, A., et al. (2007). Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology*, 68(4), 295–297.



## Bibliografía

- Lenaz, G., Fato, R., Formigini, G., & Genova, M. L. (2007a). The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S8–33.
- Lenaz, G., Fato, R., Formigini, G., & Genova, M. L. (2007b). The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7(Supplement 1), S8–S33.
- Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E., & Hekimi, S. (2005). Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes & Development*, 19(20), 2424–2434.
- Lu, J., & Clark, A. G. (2012). Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Research*, 8(7), 691–697.
- Luis, A. M., Izquierdo, J. M., Ostronoff, L. K., Salinas, M., Santarén, J. F., & Cuezva, J. M. (1993). Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1868–1875.
- Lunde, B. M., Moore, C., & Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 479–90.
- López De Silanes, I., Zhan, M., Lal, A., Yang, X., & Gorospe, M. (2004). Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2987–2992.
- López, L. C., Schuelke, M., Quinzii, C. M., Kanki, T., Rodenburg, R. J. T., Naini, A., DiMauro, S., et al. (2006). Leigh Syndrome with Nephropathy and CoQ10 Deficiency Due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) Mutations. *The American Journal of Human Genetics*, 79(6), 1125–1129.
- López-Lluch, G., Rodríguez-Aguilera, J. C., Santos-Ocaña, C., & Navas, P. (2010). Is coenzyme Q a key factor in aging? *Mechanisms of ageing and development*, 131(4), 225–35.
- Ma, W. J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., & Furneaux, H. (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8144–8151.
- Mancuso, M., Orsucci, D., Volpi, L., Calsolaro, V., & Siciliano, G. (2010). Coenzyme Q10 in neuromuscular and neurodegenerative disorders. *Current Drug Targets*, 11(1), 111–121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20017723>
- Mancuso, Michelangelo, Orsucci, D., Calsolaro, V., Choub, A., & Siciliano, G. (2009). Coenzyme Q10 and Neurological Diseases. *Pharmaceuticals*, 2(3), 134–149.
- Marbois, B N, & Clarke, C. F. (1996). The COQ7 gene encodes a protein in saccharomyces cerevisiae necessary for ubiquinone biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(6), 2995–3004.

## Bibliografía

- Marbois, B Noelle, & Clarke, C. F. (1996). The COQ7 Gene Encodes a Protein in *Saccharomyces cerevisiae* Necessary for Ubiquinone Biosynthesis \* electrons in the respiratory chains of both prokaryotes to a previously reported *Caenorhabditis elegans* open. *Biochemistry*, 271(6), 2995–3004.
- Marbois, B., Gin, P., Faull, K. F., Poon, W. W., Lee, P. T., Strahan, J., Shepherd, J. N., et al. (2005). Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *The Journal of biological chemistry*, 280(21), 20231–8.
- Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., & Clarke, C. F. (2009a). The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(1), 69–75.
- Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., & Clarke, C. F. (2009b). The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(1), 69–75.
- Martin-Montalvo, A., Gonzalez-Mariscal, I., Padilla, S., Ballesteros, M., Brautigan, D. L., Navas, P., & Santos-Ocaña, C. (2011). Respiratory-induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p.
- Martín, S. F., Gómez-Díaz, C., Bello, R. I., Navas, P., & Villalba, J. M. (2003). Inhibition of neutral Mg<sup>2+</sup>-dependent sphingomyelinase by ubiquinol-mediated plasma membrane electron transport. *Protoplasma*, 221(1-2), 109–116.
- Masuda, K., Marasa, B., Martindale, J. L., Halushka, M. K., & Gorospe, M. (2009). Tissue- and age-dependent expression of RNA-binding proteins that influence mRNA turnover and translation. *Aging Albany NY Online*, 1(8), 681–698. Retrieved from Mata, J., Marguerat, S., & Bähler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(9), 506–514.
- McAfee, J. G., Soltaninassab, S. R., Lindsay, M. E., & LeSturgeon, W. M. (1996). Proteins C1 and C2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes bind RNA in a highly cooperative fashion: support for their contiguous deposition on pre-mRNA during transcription. *Biochemistry*, 35(4), 1212–1222.
- Meganathan, R. (2001). Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 203(2), 131–139.
- Mellors, A., & Tappel, A. L. (1966). The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(19), 4353–4356.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., & Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3(3), reviews0004–reviews0004.
- Miles, M. V. (2007). The uptake and distribution of coenzyme Q10. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S72–S77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446143>

## Bibliografía

- Mollet, J., Delahodde, A., Serre, V., Chretien, D., Schlemmer, D., Lombes, A., Boddaert, N., et al. (2008). CABC1 Gene Mutations Cause Ubiquinone Deficiency with Cerebellar Ataxia and Seizures. *The American Journal of Human Genetics*, 82(3), 623–630.
- Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., et al. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 765–772.
- Montero, R., Artuch, R., Briones, P., Nascimento, A., García-Cazorla, A., Vilaseca, M. A., Sánchez-Alcázar, J. A., et al. (2005). Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *Biofactors Oxford England*, 25(1-4), 109–115.
- Montini, G., Malaventura, C., & Salviati, L. (2008). Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *The New England Journal of Medicine*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579827>
- Morré, D., & Morré, D. (2011). Non-mitochondrial coenzyme Q. *BioFactors*, n/a–n/a. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1002/biof.156>
- Mugoni, V., Postel, R., Catanzaro, V., De Luca, E., Turco, E., Digilio, G., Silengo, L., Murphy, M.P., Medana, C., Stainier, D.Y., Bakkers, J., Santoro, M. M. (2013). Ubiad1 Is an Antioxidant Enzyme that Regulates eNOS Activity by CoQ10 Synthesis. *Cell*, 152(3), 504–18.
- Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asaumi, S., Isono, K., Takao, T., et al. (2001). Mouse homologue of coq7/clk-1, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(2), 463–471.
- Nakielnny, S., & Dreyfuss, G. (1996). The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *The Journal of Cell Biology*, 134(6), 1365–1373.
- Navarro, F., Navas, P., Burgess, J. R., Bello, R. I., De Cabo, R., Arroyo, A., & Villalba, J. M. (1998). Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(15), 1665–1673.
- Navas, P., Fernandez-Ayala, D. M., Martin, S. F., Lopez-Lluch, G., De Cabo, R., Rodriguez-Aguilera, J. C., & Villalba, J. M. (2002). Ceramide-dependent caspase 3 activation is prevented by coenzyme Q from plasma membrane in serum-deprived cells. *Free Radical Research*, 36(4), 369–374.
- Navas, Plácido, Villalba, J. M., & De Cabo, R. (2007). The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S34–40.

## Bibliografía

- O., L. (1987). Role of biosynthesis of cholesterol and isoprenoid derivatives in regulation of G1 progression and cell proliferation of 3T6 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 133(1), 163–8.
- Ortega, A. D., Willers, I. M., Sala, S., & Cuezva, J. M. (2010). Human G3BP1 interacts with {beta}-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Journal of Cell Science*, 123(16), 2685–2696.
- Ozeir, M., M++hlenhoff, U., Webert, H., Lill, R., Fontecave, M., & Pierrel, F. (2011). Coenzyme Q Biosynthesis: Coq6 Is Required for the C5-Hydroxylation Reaction and Substrate Analogs Rescue Coq6 Deficiency. *Chemistry & Biology*, 18(9), 1134–1142.
- Padilla, S, Tran, U. C., Jiménez-Hidalgo, M., López-Martín, J. M., Martín-Montalvo, a, Clarke, C. F., Navas, P., et al. (2009). Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(1), 173–86.
- Padilla, Sergio, Jonassen, T., Jiménez-Hidalgo, M. a, Fernández-Ayala, D. J. M., López-Lluch, G., Marbois, B., Navas, P., et al. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *The Journal of biological chemistry*, 279(25), 25995–6004.
- Papadopoulou, C., Patrinoú-Georgoula, M., & Guialis, A. (2010). Extensive association of HuR with hnRNP proteins within immunoselected hnRNP and mRNP complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(4), 692–703.
- Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., et al. (2003). Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28220–28228.
- Park YM, Hwang SJ, Masuda K, Choi KM, Jeong MR, Nam DH, Gorospe M, K. H. (2012). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C1/C2 Controls the Metastatic Potential of Glioblastoma by Regulating PDCD4. *Molecular and Cellular Biology*, 32(20), 4237–44.
- Parrado-Fernández, C., López-Lluch, G., Rodríguez-Bies, E., Santa-Cruz, S., Navas, P., Ramsey, J. J., & Villalba, J. M. (2011). Calorie restriction modifies ubiquinone and COQ transcript levels in mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(12), 1728–1736.
- Pascale, A., & Govoni, S. (2011). The complex world of post-transcriptional mechanisms: is their deregulation a common link for diseases? Focus on ELAV-like RNA-binding proteins. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 69(4), 501–17.
- Pepe, S., Marasco, S. F., Haas, S. J., Sheeran, F. L., Krum, H., & Rosenfeldt, F. L. (2007). Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S154–S167.
- Pesole, G., Mignone, F., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F., & Liuni, S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*, 276(1-2), 73–81.

## Bibliografía

- Piñol-Roma, S. (1997). HnRNP proteins and the nuclear export of mRNA. *Seminars in cell developmental biology*, 8(1), 57–63.
- Piñol-Roma, S., & Dreyfuss, G. (1993). hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends in Cell Biology*, 3(5), 151–155.
- Pullmann Jr., R., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Martindale, J. L., Yang, X., & Gorospe, M. (2007). Analysis of Turnover and Translation Regulatory RNA-Binding Protein Expression through Binding to Cognate mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), 6265–6278.
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Mañas, M., Battino, M., Cassinello, M., Littarru, G. P., Lenaz, G., et al. (1994). Peroxidative extent and coenzyme Q levels in the rat: influence of physical training and dietary fats. *Molecular Aspects of Medicine*, 15 Suppl, s89–s95.
- Quinzii, C. M., DiMauro, S., & Hirano, M. (2007). Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochemical research*, 32(4-5), 723–7.
- Quinzii, C. M., & Hirano, M. (2010). Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 183–188.
- Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., & Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 78(2), 345–349.
- Rasola, A., & Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12(5), 815–833.
- Reddy JK, C. R. (1996). Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: pursuit of a phenomenon. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804, 176–201.
- Rogaev, E. I., Borinskaia, S. A., Islamgulov, D. V., & Grigorenko, A. P. (2008). Human microRNA in norm and pathology. *Molekuliarnaia Biologiya*, 42(5), 751–764.
- Sacconi, S., Trevisson, E., Salviati, L., Aymé, S., Rigal, O., Redondo, A. G., Mancuso, M., et al. (2010). Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscular disorders NMD*, 20(1), 44–48.
- Sachs, A. B. (1993). Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell*, 74(3), 413–421.
- Salviati, L., Trevisson, E., Rodriguez Hernandez, M. A., Casarin, A., Pertegato, V., Doimo, M., Cassina, M., et al. (2011). Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 49(3), 187–91.
- Santos-Ocaña, C., Do, T. Q., Padilla, S., Navas, P., & Clarke, C. F. (2002). Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast coq mutants. *The Journal of biological chemistry*, 277(13), 10973–81.

## Bibliográfia

- Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M. M., & Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with “mini-extracts”, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research*, 17(15), 6419.
- Shepard, T. H., Muffley, L. A., & Smith, L. T. (2000). Mitochondrial ultrastructure in embryos after implantation. *Human reproduction Oxford England*, 15 Suppl 2, 218–228.
- Shults CW, Haas RH, Passov D, B. M. (1997). Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Annals of Neurology*, 42(2), 261–4.
- Simone LE, K. J. (2013). Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons. *Current Opinion in Genetic and Development*.
- Srikantan S, Tominaga K, G. M. (2012). Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Current Protein and Peptide Science*, 13(4), 372–9.
- Srikantan, S., & Gorospe, M. (2012). HuR function in disease. *Frontiers in bioscience a journal and virtual library*, 17, 189–205.
- Stepanyan, Z., Hughes, B., Cliche, D. O., Camp, D., & Hekimi, S. (2006). Genetic and molecular characterization of CLK-1/mCLK1, a conserved determinant of the rate of aging. *Experimental Gerontology*, 41(10), 940–951.
- Tzagoloff, a, & Dieckmann, C. L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, 54(3), 211–25.
- Vajo, Z., King, L. M., Jonassen, T., Wilkin, D. J., Ho, N., Munnich, A., Clarke, C. F., et al. (1999). Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mammalian genome official journal of the International Mammalian Genome Society*, 10(10), 1000–1004.
- Villalba, J. M., & Navas, P. (2000). Plasma membrane redox system in the control of stress-induced apoptosis. *Antioxidants redox signaling*, 2(2), 213–230.
- Walter, L., Miyoshi, H., Leverve, X., Bernard, P., & Fontaine, E. (2002). Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free Radical Research*, 36(4), 405–412.
- Wang, W., Caldwell, M. C., Lin, S., Furneaux, H., & Gorospe, M. (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 19(10), 2340–2350.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M. C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., et al. (2000). HuR Regulates p21 mRNA Stabilization by UV Light. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 760–769.



## Bibliografía

- Wang, W., Yang, X., Cristofalo, V. J., Holbrook, N. J., & Gorospe, M. (2001). Loss of HuR Is Linked to Reduced Expression of Proliferative Genes during Replicative Senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5889–5898.
- Williamson, D. J., Banik-Maiti, S., DeGregori, J., & Ruley, H. E. (2000). hnRNP C is required for postimplantation mouse development but is dispensable for cell viability. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4094–4105.
- Willis RA, Folkers K, Tucker JL, Ye CQ, Xia LJ, T. H. (1990). Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(22), 8928–30.
- Wolf, D. E., Hoffman, C. H., Trenner, N. R., Arison, B. H., Shunk, C. H., Linn, B. O., McPerson, J. F., Folkers, K. (1958). Coenzyme Q. Structure studies on the Coenzyme Q group. *Journal of the American Chemical*, 80(17), 4750–52.
- Wong, A., Boutis, P., & Hekimi, S. (1995). Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*, 139(3), 1247–1259.
- Xie, L. X., Hsieh, E. J., Watanabe, S., Allan, C. M., Chen, J. Y., Tran, U. C., & Clarke, C. F. (2011). Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811(5), 348–360.
- Xiong W, Jiao Y, Huang W, Ma M, Yu M, Cui Q, T. D. (2012). Regulation of the cell cycle via mitochondrial gene expression and energy metabolism in HeLa cells. *Acta Biochimica et biophysica Sinica (Shanghai)*, 44(4), 347–58.
- Zou, T., Rao, J. N., Liu, L., Xiao, L., Yu, T. X., Jiang, P., Gorospe, M., et al. (2010). Polyamines regulate the stability of JunD mRNA by modulating the competitive binding of its 3'-untranslated region to HuR and AUF1. *Molecular and Cellular Biology*, MCB.